

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Klinická a toxikologická analýza



Bc. Zuzana Hampejsová

FUNKČNÍ ROLE ISLET1 BĚHEM
NEUROSENZOROVÉHO VÝVOJE VNITŘNÍHO UCHA

Functional role of ISLET1 in the neurosensory development
of the inner ear

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: RNDr. Gabriela Pavlínková, Ph.D.

Konzultant: RNDr. Petr Man, Ph.D.

Praha 2014

Tato diplomová práce vznikla v souvislosti s řešením výzkumného záměru MSM0021620857.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

Jsem si vědoma toho, že případné využití výsledků získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu v Praze, je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne 16. května 2014.

Poděkování

Ráda bych poděkovala své školitelce RNDr. Gabriele Pavlíkové, Ph.D. za její skvělý přístup k mé práci a hlavně lidskost, s jakou mi pomáhala a radila během psaní této práce. Dále bych chtěla poděkovat RNDr. Petru Manovi, Ph.D. za jeho pomoc při vypracování této práce. Také děkuji Ing. Romaně Bohuslavové za její pomoc při vypracovávání experimentální části práce a nekonečný optimismus. V neposlední řadě bych chtěla poděkovat Mgr. Radce Čerychové a Bc. Kateřině Nepomucké za jejich pomoc a za neutichající projevy náklonnosti k mé osobě. Dále bych ráda poděkovala celému kolektivu Laboratoře molekulární patogenetiky. Na závěr chci poděkovat své rodině za trpělivost, kterou se mnou měla během psaní této práce.

Abstrakt

Ztrátou sluchu trpí více než 10 % lidské populace, jeden z tisíce novorozenců se rodí s poškozeným sluchovým aparátem. K pochopení příčiny ztráty sluchu je třeba prozkoumat transkripční faktory ovlivňující vývoj orgánu sluchu, vnitřního ucha. ISLET1 je transkripční faktor ovlivňující vývoj vnitřního ucha. Exprese ISLET1 byla během embryonálního vývoje vnitřního ucha detekována v sensorické i neurální tkáni. Tato práce přispívá k objasnění funkční role ISLET1 ve vývoji vnitřního ucha prostřednictvím transgenního myšího modelu *Pax2-Isl1* vytvořeného vložením genu *Islet1* pod regulaci *Pax2* promotoru. Náš předpoklad byl, že navýšení exprese ISLET1 ovlivní vývoj sluchového i vestibulárního systému. Byly vytvořeny dvě transgenní linie *Pax2-Isl1/300* a *Pax2-Isl1/52*. Do genomu linie *Pax2-Isl1/300* byly vloženy dvě kopie transgenu *Pax2-Isl1* a do linie *Pax2-Isl1/52* byla vložena jedna kopie transgenu. U obou transgenních linií bylo zjištěno poškození sluchu u dospělých jedinců, u linie *Pax2-Isl1/300* dochází navíc k poškození rovnovážného systému, které se projevuje ve formě tzv. „circling behavior“. U obou linií byla diagnostikována zvýšená postnatální úmrtnost heterozygotně mutantních jedinců. U homozygotně mutantních jedinců linie *Pax2-Isl1/52* byl vývoj embrya letální v 10,5 dni embryonálního vývoje. U linie *Pax2-Isl1/300* nebylo možné získat homozygotně mutantní populaci. Vložení transgenu vedlo u obou linií embryí v 10,5 dni embryonálního vývoje k navýšení exprese ISLET1 ve ventrální části otického epitelu, sousedící se statoakustickým gangliem, a v mediální části otického váčku, oblasti domény exprese proteinu PAX2. Navýšení exprese ISLET1 bylo dále detekováno v gangliových buňkách inervujících kochleární trubici ve 13,5 dni embryonálního vývoje. Ve stejném věku nebylo zjištěno zvýšení exprese ISLET1 v sensorické oblasti formující se basální části kochleární trubice ani v sakulu vestibulárního systému. Bylo potvrzeno, že ISLET1 je transkripčním faktorem ovlivňujícím vývoj vnitřního ucha a že zvýšením exprese ISLET1 v embryonálním věku pomocí transgenu *Pax2-Isl1* dochází k ovlivnění fenotypu a funkčním změnám sensorických orgánů vnitřního ucha.

Klíčová slova

kochleární trubice, MyosinVIIa, otický váček, PAX2, sakulus, transgenní model *Pax2-Isl1*, transkripční faktor

Abstract

Loss of hearing affects more than 10 % of the population, and one newborn in a thousand is born with defects of the inner ear. Transcriptional factors involved in the development of inner ear are important in our understanding of the causes of inner ear defects. ISLET1 is one of these factors. ISLET1 expression is detected in the sensory and neuronal cells of the inner ear. It participates in otocyst formation, and the specification and differentiation of cells of cochlea and vestibular system. The functional role of ISLET1 during inner ear development was investigated. Its role was studied by using *Pax2-Isl1* transgenic mice that overexpress *Islet1* under the control of the Pax2 promoter. Two transgenic lines were generated, *Pax2-Isl1/300* and *Pax2-Isl1/52*. Two copies of the *Pax2-Isl1* transgene were inserted to *Pax2-Isl1/300* genome and one copy was inserted to the *Pax2-Isl1/52* genome. Defects in sense of hearing were detected in both lines and circling behavior, a defect of balance, was detected in the *Pax2-Isl1/300* transgenic mice. We observed high postnatal lethality in heterozygote transgenic mice. *Pax2-Isl1/52* homozygote mutation is lethal at embryonic day 10 (E10,5). *Pax2-Isl1/300* homozygote lethality couldn't be detected because of the inability to breed heterozygote mutated mice of this line. Insertion of *Pax2-Isl1* transgene leads to increasing ISLET1 expression in the ventral part of otocyst, the part closest to the statoacoustic ganglion, and in the medial part with significant expression of PAX2. An increase of ISLET1 expression was also detected in the neuronal cells innervating the cochlear duct at embryonic day 13 (E13.5). No expression changes were found in the sensory part of forming cochlear duct or the sacculus, a vestibular organ, at embryonic day (E13.5). It was confirmed that ISLET1 is a transcription factor involved in the development of the inner ear, and that ISLET1 overexpression initiates phenotypic and functional changes of sensory organs of the developing inner ear.

Key words

Cochlear duct, Myosin VIIa, PAX2, otocyst, sacculus, transgenic model Pax2-Isl1, transcriptional factor

Obsah

Seznam zkratk	9
1. Úvod	11
2. Teoretický úvod	12
2.1 Morfologie vnitřního ucha	12
2.2 Buňky vnitřního ucha a jejich funkce	14
2.3 Morfologický vývoj vnitřního ucha myši	18
2.4 Specifikace buněk vnitřního ucha	20
2.4.1 Specifikace proenzymické tkáně	20
2.4.5 Specifikace neurální tkáně	22
2.5 PAX2	23
2.6 ISLET1	23
2.7 Myosin VIIa	25
Cíle práce	26
3 Experimentální část	27
3.1 Materiál	27
3.1.1 Chemikálie	27
3.1.2 Enzymy	28
3.1.3 Protilátky	28
3.1.4 Primery	28
3.1.5 Komerční soupravy	28
3.1.6 Příprava roztoků	29
3.1.7 Modelový organismus	30
3.1.8 Ostatní materiál	31
3.1.9 Přístroje	32
3.1.10 Počítačové programy	32

3.2 Pracovní postupy	33
3.2.1 Izolace myších embryí.....	33
3.2.2 Izolace DNA	33
3.2.3 Stanovení koncentrace a čistoty DNA.....	34
3.2.4 Genotypizace	34
3.2.4.1 Stanovení genotypu	34
3.2.4.2 Odlišení heterozygotů a homozygotů	36
3.2.5 Příprava řezů z mražených tkání	37
3.2.6 Histologické barvení hematoxylin-eosinem	37
3.2.7 Imunohistochemické barvení řezů mražených tkání	38
3.2.8 Stanovení počtu kopií vloženého genu <i>Isl1</i> metodou qPCR	41
4 Výsledky	43
4.1 Popis fenotypu myšího modelu <i>Pax2/Isl1</i>	43
4.2 Stanovení počtu vložených kopií transgenu <i>Isl1</i>	43
4.3 Vliv mutace na průměrné počty izolovaných embryí na vrh.....	44
4.4 Fenotyp u izolovaných embryí	46
4.5 Exprese ISLET1 v otickém váčku u E10.5 embryí	47
4.6 Exprese ISLET1 ve vestibulárním systému embryí věku E13,5	53
4.7 Exprese ISLET1 v basální části kochleární trubice u embryí věku E13,5	54
5 Diskuze	57
5.1 Fenotyp transgenního myšího modelu <i>Pax2-Isl1</i>	57
5.2 Embryonální letalita homozygotní mutace jedinců transgenní linie <i>Pax2-Isl/300</i> a <i>Pax2-Isl1/52</i>	58
5.3 Morfologické a expresní změny ISLET1 v oblasti otického váčku u embryí stáří E10,5	59
5.4 Morfologické a expresní změny ISLET1 u embryí věku E13,5	60

5.5 Odůvodnění projevů fenotypu transgenního modelu <i>Pax2-Isl1</i> obou linií	62
6 Závěr	64
Citace	66

Seznam zkratek

A	Plocha
<i>Atoh1</i>	Transkripční faktor (z anglického <i>Atonal homolog 1</i>)
<i>BMP4</i>	Transkripční faktor (z anglického <i>Bone Morphogenic Protein 4</i>)
bp	Pár bází (z anglického <i>base pair</i>)
BSA	Hovězí sérový albumin (z anglického <i>Bovine serum albumin</i>)
Cq	Cyklus detekce exprese genu (z anglického <i>Quantification cycle</i>)
DPX	Montovací činidlo pro histologické řezy, směs distyrenu, změkčovadla a xylenu (z anglického <i>distyrene, plasticizer, xylene</i>)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribonukleová kyselina (z anglického <i>deoxyribonucleic acid</i>)
E	Embryonální den
EDTA	Ethylendiamintetraoctová kyselina (z anglického <i>ethylenediaminetetraacetic acid</i>)
<i>Eya1</i>	Transkripční faktor (z anglického <i>Eyes absent homolog 1</i>)
g	Relativní odstředivé zrychlení (z anglického <i>relative centrifugal force</i>)
<i>Gata3</i>	Transkripční faktor (z anglického <i>Gata binding protein 3</i>)
<i>Hprt1</i>	Gen pro <i>Hypoxanthine-guaninephosphoribosyltransferasu 1</i>
<i>Isl1</i>	LIM/homeodoménový transkripční faktor (z anglického <i>Islet 1</i>)
<i>Jag1</i>	Transkripční faktor (z anglického <i>Jagged1</i>)
LIM-HD	<i>Lin11-Islet1-Mec3</i> homeboxová doména
<i>Lnfg</i>	Transkripční faktor (z anglického <i>Lunatic fringe</i>)
<i>Neurog1</i>	Transkripční faktor (z anglického <i>Neurogenin1</i>)
<i>NeuroD</i>	Transkripční faktor (z anglického <i>Neuronal differentiation</i>)
Otáčky/min	Jednotky rychlosti otáčení rotoru centrifugy
P	Postnatální den
<i>Pax2</i>	Transkripční faktor (z anglického <i>Paired box 2</i>)
PBS	Fosfátový pufr (z anglického <i>phosphate buffered saline</i>)
PCR	Polymerasová řetězová reakce (z anglického <i>polymerase chain reaction</i>)

qPCR	Kvantitativní polymerasová řetězová reakce (z anglického <i>quantitative polymerase chain reaction</i>)
PFA	Paraformaldehyd
RNA	Ribonukleová kyselina (z anglického <i>ribonucleic acid</i>)
SDS	Dodecylsulfát sodný
Sox2	Transkripční faktor (z anglického (<i>Sex determining region Y</i>)- <i>box 2</i>)
TBE	Tris(hydroxymethyl)aminomethan-kyselina boritá- ethylendiamintetraoctová kyselina
Tbx1	Transkripční faktor (z anglického <i>T-box1</i>)
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
wt	Nemutantní jedinec, divoký typ (z anglického <i>wild type</i>)

1. Úvod

Vnitřní ucho je sensorický orgán zodpovědný za sluch a rovnováhu organismu. Sluch je jedním ze základních smyslů a jeho ztráta je značným zásahem do lidského života. V současné době ztrátou sluchu trpí více než 10 % lidské populace. Ke ztrátě sluchu může docházet rozmanitými způsoby, kterými může být vrozená vada, mutace nebo mechanické narušení sluchu. Na rozdíl od jiných poškození lidského organismu je toto poškození nevratné. Veškeré buňky vnitřního ucha jsou neobnovitelné, ať k jejich poškození dojde jakýmkoliv způsobem.

Léčba poruch lidského sluchu zatím nebyla nalezena. Existují sice zařízení, která pomáhají a zesilují zvukový signál ve vnitřním uchu, ale nemohou úplně nahradit ztracený sluch. Mezi tato zařízení patří sluchadla, aktivní středoušní implantáty, kostní implantáty, hybridní, kruhové implantáty a v neposlední řadě implantáty kochleární.

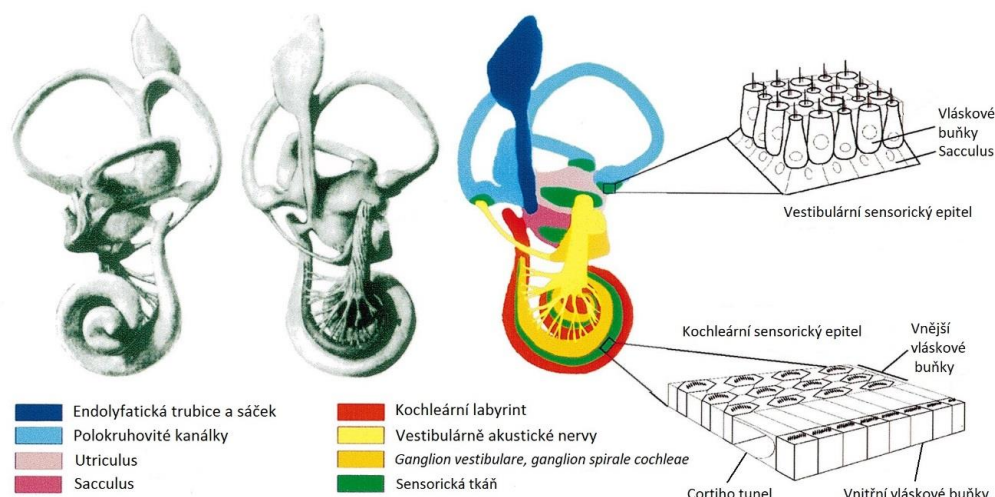
Zdaleka nejvyvinutějšími a momentálně nejlepšími implantáty jsou kochleární implantáty. Pro jejich implantaci musí pacient splňovat mnoho náročných kritérií a při absolutní ztrátě sluchu jsou naprosto bezpředmětné. Nevhodné jsou dále i pro děti, u kterých ještě nejsou vyvinuty základy řeči.

Vzhledem k neobnovitelnosti tkáně vnitřního ucha se pohled vědců upírá ke kmenovým buňkám, což jsou nediferencované buňky schopné se dělit a diferencovat v různé typy buněk. Z tohoto důvodu je třeba pochopit a porozumět neurosensorovému vývoji vnitřního ucha a zjistit role genů ovlivňujících vývoj ucha. Jedním z genů významně ovlivňujícím vývoj vnitřního ucha je gen *Islet1*.

2. Teoretický úvod

2.1 Morfologie vnitřního ucha

Vnitřní ucho je uloženo v kosti skalní (*os petrosus*). Tvoří ho kostěný labyrint (*labyrinthus osseus*) složený z kostěných dutin a kanálků (Obr. 2.1). Uvnitř kostěného labyrintu je umístěn labyrint blanitý (*labyrinthus membranaceus*). Dutiny kostěného labyrintu jsou vyplněny perilymfou a jsou vystlány okosticí (*periost*). Kostěný labyrint je složen ze tří hlavních částí: vestibula (*vestibulus*), tří polokruhových kanálků (*canales semicirculares ossei*) a kostěného hlemýždě (*cochlea*). Ve vestibulu jsou uloženy sakulus (*sacculus*) a utrikulus (*utrículus*), dva váčky blanitého vestibulárního hlemýždě. Polokruhové kanálky jsou na sebe navzájem kolmé a jsou orientovány podle podélné osy kosti skalní. Přední polokruhový kanálek se klene nahoru kolmo na podélnou osu, zadní polokruhový kanálek je klenutý dozadu rovnoběžně s touto osou. Mezi nimi se nachází boční polokruhový kanálek. Ústí kanálků vycházející z přední části vestibula jsou označována jako lahvicovitá rozšíření kanálků (*ampullae osseae*) a ústí ze zadní části se nazývají kostěná ramínka (*crura ossea*). Do kostěného labyrintu vedou dvě okénka: *fenestra vestibuli*, otvor do perilymfatického prostoru vestibula, a *fenestra cochleae*, okénko kryté tenkou membránou, vnitřním bubínkem, ústící do kostěného hlemýždě.



Obr. 2.1 Struktura vnitřního ucha. Vlevo na obrázcích je znázorněna struktura kostěného hlemýždě, na obrázku vpravo jsou barevně znázorněny části hlemýždě a ve výřezích je znázorněn vestibulární a kochleární epitel. Převzato a upraveno podle (Torres and Giraldez, 1998).

Kostěný hlemýžď je u člověka složen z 2,5-2,75 závitů se zmenšujícím se poloměrem. Uprostřed hlemýždě se nachází kostěná osa (*modiolus*), tvořící vnitřní stěnu kostěného kanálku, kolem níž se vinou závitů kanálku. Zevní stěnu kanálku tvoří spirální kostěná lišta (*lamina spiralis ossea*). Nalézá se uprostřed kanálku a částečně jej rozděluje na dvě části. Od jejího vnitřního okraje odstupuje basální membrána (*lamina basilaris*) dosahující až k okraji vnější části kanálku a tím úplně rozděluje kanálek na horní prostor (*scala vestibuli*) a dolní prostor (*scala tympani*). Od zevního okraje kostěné lišty odstupuje vestibulární membrána (*membrana vestibularis*) šikmo vzhůru k zevní části kanálku hlemýždě. Basální membrána, vestibulární membrána a zevní stěna kanálku tak tvoří prostor uložení blanitého hlemýždě umístěného ve *scala media*.

Blanitý labyrint je vystlán epitelem a vyplněn endolymfou. Je rozdělen na dvě části podle jejich funkce na vestibulární (rovnovážný) labyrint (*labyrinthus vestibularis*) a kochleární (sluchový) labyrint (*labyrinthus cochlearis*).

Vestibulární blanitý labyrint je umístěn v kostěném labyrintu tak, že k jeho vazivové vnější části jsou přichycena vazivová vlákna vedoucí k okostici a za pomoci těchto vláken je udržován ve stálé poloze. Labyrint je tvořen dvěma vāčky, utrikulem a sakulem. Na stěnách obou vāček jsou umístěny *maculae staticae*, obsahující vlāskové buňky. Na jejich povrchu se nachází otolitovā membrāna (*membrana otoconialis*). Vāčky jsou spojeny utrikulosakulárním kanálkem (*ductus utriculosaccularis*), z nějž vybíhá endolymfatický kanálek (*ductus endolymphaticus*), jehož slepý konec vytváří endolymfatický vāček (*sacculus endolymphaticus*). Další částí labyrintu jsou tři blanité polokruhovitě kanálky (*ducti semicirculares*) uložené uvnitř kostěných kanálků. Také mají na jedné straně lahvicovitā rozšíření a na druhé kostěná raménka. V lahvicovitých rozšířeních se nachází ampulární krusty (*crystallae ampullares*), další orgány tvořené smyslovou tkání.

Kochleární labyrint (*ductus cochlearis*) obsahuje Cortiho orgán (*organum spirale*), který je složen ze tří řad zevních a jedné řady vnitřních vlāskových sluchových buněk, směřujících řasinkami do prostoru vyplněného endolymfou, a podpůrných buněk. Podpůrné buňky mají cylindrický tvar a jejich rozšířené konce vytvářejí nad Cortiho tunelem retikulární membrānu (*membrana tectoria*). Tato membrāna pokrývá žlábk mezi zevním okrajem spirální kostěné lišty (*lamina spiralis ossea*) a Cortiho

orgánem, dále pokrývá Cortiho orgán a stereocilie vláskových buněk. Vláškové buňky jsou inervovány gangliovými buňkami, jejichž hlavní funkcí je přenášet sluchový podnět z vláskových buněk do centrální nervové soustavy (Čihák and Helekal, 1997, Kelley *et al.*, 2006).

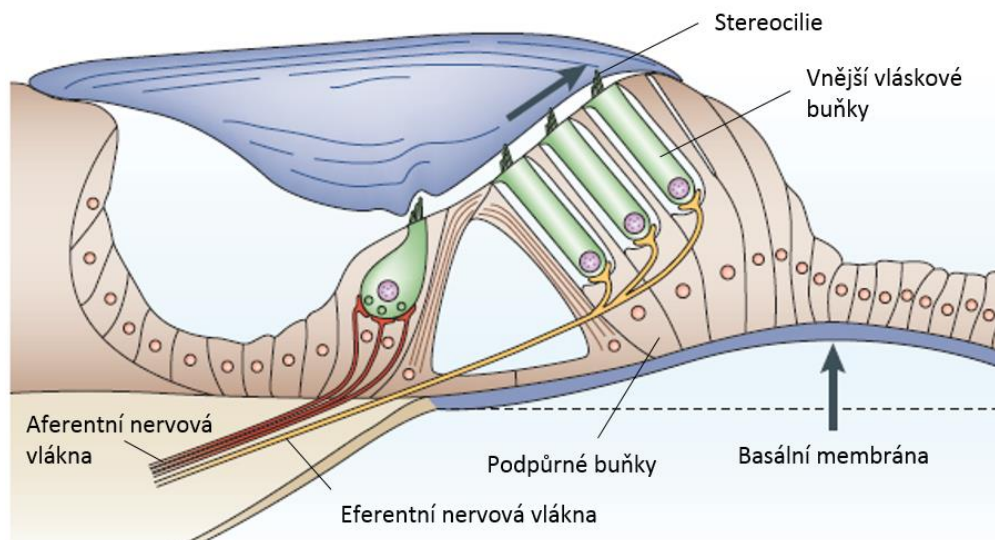
2.2 Buňky vnitřního ucha a jejich funkce

Orgány vnitřního ucha obsahují nesenzorické, senzorické a nervové buňky. Mezi nesenzorické orgány patří *stria vascularis*, vrstva na povrchu kostěného labyrintu produkující endolymfu, endolymfatická trubice a sáček. Dalšími zástupci jsou kubické epitelální buňky (*periostr*) vystylající polokruhovitě kanálky a ostatní orgány. Senzorickými buňkami jsou buňky vláskové a podpůrné.

Vnitřní ucho savců je orgán skládající se ze senzorických orgánů trojího typu. Prvním typem jsou ampulární krysty nacházející se v polokruhových kanálcích. Ty slouží k rozpoznání úhlového zrychlení. Dalším typem orgánů jsou makuly (*maculae staticae*), umístěné v sakulu a utrikulu, které rozpoznávají přímé zrychlení a gravitaci, a posledním orgánem je Cortiho orgán rozpoznávající zvuk (Fekete, 1996).

Vláškové buňky jsou mechanosenzorické buňky tvořící vysoce uspořádanou tkáň. Na jejich povrchu jsou umístěny stereocilie. Dělí se na sluchové (kochleární) a vestibulární vláskové buňky podle místa působení. Dále můžeme sluchové buňky dělit na vnější a vnitřní vláskové buňky.

Sluchové vláskové buňky umístěné v blanitém hlemýždi jsou zodpovědné za detekci nebo vnímání zvuku. Principiálně převádí mechanické podněty způsobené zvukovými vlnami na elektrický signál nervového vzruchu. Sluchové podněty jsou přenášeny do vnitřního ucha skrze střední ucho. Speciální struktury středního ucha převádějí zvukové vlny na mechanickou vibraci perilymfy vyplňující kostěný labyrint. Vibrace perilymfy způsobí rozkmitání vestibulární membrány a ta přenesení vibraci na endolymfatickou kapalinu v blanitém hlemýždi. Endolymfatická kapalina rozvlní basální membránu a vlna postupuje kochleárním labyrintem do místa, kde dosáhne své maximální amplitudy. Dosažením amplitudy k sobě basální membrána posune retikulární membránu, která změní polohu stereocilií vnějších vláskových buněk do ní zanořených viz. Obr. 2.2 (str. 15) (Schnupp *et al.*, 2011, Torres and Giraldez, 1998).



Obr. 2.2 Buněčná struktura Cortiho orgánu a jeho úloha při přenosu zvuku.

Na obrázku je znázorněna struktura Cortiho orgánu. Zvednutím basální membrány dojde ke stimulaci vláskových buněk prostřednictvím změny polohy stereocilií zanořených do retikulární membrány, tím dojde k otevření draselných kanálů na konci stereocilií a následně dojde k depolarizaci membrány vláskových buněk, aktivaci přenosu neurotransmiterů přes membránu vláskové buňky na nervové zakončení a dojde tak k přenosu nervového vzruchu. Převzato a upraveno dle (Fettiplace and Hackney, 2006).

Stereocilie jsou umístěny na vrchní části vnějších vláskových buněk. Jakmile basální membrána posune retikulární membránu, otevřou se draselné kanály umístěné na konci stereocilií. Čím větší je změna polohy stereocilií, tím více draselných kanálů se otevře. Prostřednictvím draselných kanálů se dostanou draselné ionty do vláskové buňky, ionty zaplaví buňku a membrána buňky získává svůj akční potenciál. Následně pak dojde k depolarizaci membrány otevřením jejích vápenato-draselných kanálů. Vápenaté ionty aktivují přenos neurotransmiterů přes membránu buňky na nervové zakončení a dochází tak k přenosu nervového vzruchu. Poté se repolarizuje buněčná membrána a následuje vypuzení přebytečných draselných iontů z buňky do okolí (Forge and Wright, 2002).

Repolarizace membrány vnějších vláskových buněk způsobí zvýšenou koncentraci draselných iontů ve vnějším prostředí a tudíž depolarizaci membrány vnějších vláskových buněk. Zvuková vlna tak prostřednictvím zvýšené koncentrace draselných iontů přejde k vnitřním vláskovým buňkám. Vnější vláskové buňky jsou inervovány hlavně eferentními kochleárními neurony (primárními neurony typu II) a slouží k zesílení odpovědi Cortiho orgánu na konkrétní zvuk. Po zesílení signálu

směrem k vnitřním vláskovým buňkám dochází k depolarizaci membrán těchto buněk. Ta probíhá stejně jako na vnějších vláskových buňkách. Tímto dojde k převodu mechanického vlnění na elektrický signál, který je přenášen na zakončení aferentních vláken (vláken primárních neuronů typu I) přilehlých sluchových nervů *ganglion spiralis cochleae*. Poloha vláskových buněk vzhledem k primárním neuronům typu I musí být rovnoběžná, aby došlo ke správnému přenosu signálu.

Přenos různých zvukových vln je dán jejich frekvencemi. Každá zvuková vlna má svou frekvenci. Čím vyšší je frekvence vlny, tím dříve dojde k dosažení maximální amplitudy, tudíž zvuková vlna s vyšší frekvencí bude převedena v části labyrintu blíže k basální membráně, kdežto vlna s nižší frekvencí projde mnohem dále do labyrintu. Z určitého místa blanitého hlemýždě tedy vedou do mozku aferentní nervová vlákna nesoucí zvukovou informaci jediné frekvence (Schnupp *et al.*, 2011).

Vestibulární vláskové buňky jsou zodpovědné za vnímání pohybu a polohy organismu vzhledem k odchylce hlavy ke směru působení gravitační síly (Torres and Giraldez, 1998). Vestibulární funkce je spojená s pohyby endolymfatické kapaliny v semicirkulárních kanálcích a pozici otolitů (*statoconie, otoconie*), drobných krystalků uhličitanu vápenatého umístěných na otolitové membráně, tj. želatinozní membráně pokrývající makuly, na kterou působí svou hmotností ve směru gravitace. Pohyby kapaliny a pozice otolitů jsou zaznamenány stereociliemi vláskových buněk v makulách a ampulárních krystkách, vláskové buňky tak detekují směr a rychlost cirkulující kapaliny a pohyb otolitů. K detekci pozice a akcelerace je vyžadována přesná osa orientace vestibulárního aparátu.

Parametry ovlivňující vlastnosti vláskových buněk jsou tedy směr pohybu endolymfatické kapaliny a pohyb otolitů. Vlivy rozmístění endolymfy na ampulární krysty předního a zadního semicirkulárního kanálku jsou opačné, když je endolymfatická kapalina vytlačena od ampulárních kryst, dojde k aktivaci gangliových neuronů, naopak její kontakt s buňkami ampulárních kryst má inhibiční efekt na neurony. Dalším parametrem ovlivňujícím vnímání polohy hlavy a těla je otolitová membrána a otolity umístěné v ní. Membrána se změnou polohy hlavy buď tlačí, nebo táhne vlásy vláskových buněk, do ní zanořených. Způsob dráždění buněk se mění se změnou polohy hlavy (Nieuwenhuys, 2008).

Vestibulární vnitřní vláskové buňky jsou obklopeny aferentními nervovými zakončeními a nacházejí se ve střední části makul a ampulárních krist. Jsou inervovány gangliovými buňkami přenášejícími signál na velké až středně velké axony vestibulárního nervu. Tyto axony jsou charakteristické pro nepravidelné klidové elektrické výboje.

Druhým typem jsou vnější vláskové buňky, cylindrické buňky s eferentními nervovými zakončeními. Nacházejí se v okrajových částech makul a ampulárních krist. Signál je z cylindrických buněk přenášen gangliovými neurony na malé až středně velké axony vestibulárního nervu, pomalu vedoucí axony s pravidelným klidovým výbojem. Na povrchu mají mikroklky (Nieuwenhuys, 2008).

Podpůrné buňky jsou mechanickou podporou vláskových buněk. Hrají významnou roli při mechanické aktivitě vedoucí ke stimulaci vláskových buněk k odpovědi na zvukový podnět (Forge and Wright, 2002). Cortiho orgán obsahuje 5-7 typů podpůrných buněk. Množství typů podpůrných buněk je dáno nepřesnou definicí podpůrné buňky, jakožto každé buňky spojené s vláskovou buňkou, a nezávisí na druhu organismu. Převážná většina podpůrných buněk se nachází v okolí basální membrány kochleární trubice, ale jejich výběžky zasahují do plochy *lumen* (Driver and Kelley, 2009).

Posledním typem buněk vnitřního ucha jsou neurální buňky. Jejich hlavní funkcí je přenos sluchového podnětu z vláskových buněk do centrální nervové soustavy. Tyto buňky jsou z jedné strany v kontaktu s vláskovými buňkami prostřednictvím dendritů a vedou podnět skrze axony do kochleárního jádra umístěného v mozgovém kmeni. Tyto axony tvoří sluchový nerv. Depolarizace vláskových buněk vede ke zvýšení množství uvolněných neurotransmiterů, vyvolávajících stupňující se potenciál na dendritech primárních sluchových neuronů. Když tyto potenciály dosáhnou určité (propouštěcí) hladiny vytvoří se akční potenciál podél vláken sluchového nervu. Vzniklý vzruch je poté veden do centrální nervové soustavy.

Primární neurony jsou rozděleny do dvou typů podle morfologie. Dělí se na primární neurony typu I a typu II. Typ I jsou široké, bipolární (jeden denrit, jeden axon) myelinované neurony tvořící 90-95 % celkové populace primárních neuronů.

Typ II jsou úzké, pseudo-unipolární (dendrit i axon mají jeden společný kmen), nemyelinované neurony tvořící 5-10 % celkové populace primárních neuronů.

Dendrity primárních neuronů typu I jsou spojeny s vnitřními vláskovými buňkami Cortiho orgánu. Tyto dendrity jsou primárně nerozvětvené, což znamená, že každý neuron typu I je spojen jen s jednou vnitřní vláskovou buňkou. Každá vnitřní vlásková buňka je inervována deseti až dvaceti dendrity neuronů typu I. Naproti tomu dendrity primárních neuronů typu II jsou rozvětvené, a proto jsou spojeny s několika (deseti a více) vnějšími vláskovými buňkami. Vnější vláskové buňky jsou skrze nervová zakončení spojeny s více primárními neurony typu II.

Vlákna sluchového nervu odpovídající axonům primárních neuronů jsou vedena do mozkového kmene do oblasti kochleárního jádérka, kde vlákna tvoří synaptické spojení se sekundárními neurony. Po vstupu do kochleárního jádérka se aferentní zakončení primárních neuronů rozdvoují. Vytvářejí dvě větve inervující odlišné oblasti kochleárního jádérka. Anteriorní větev inervuje anteroventrální oblast a posteriorní větev inervuje posteroventrální oblast.

Kochleární jádérko je prvním jádrem centrální sluchové dráhy a obsahuje sekundární nervové buňky, které přijímají stoupající informaci vláken sluchového nervu, která končí v centrální nervové soustavě. Neurony centrální nervové soustavy tedy přijímají signál začínající v kochleárním labyrintu skrze synapse mezi terminálními axony primárních neuronů a svými dendrity (Ehret *et al.*, 1997, Nieuwenhuys, 2008).

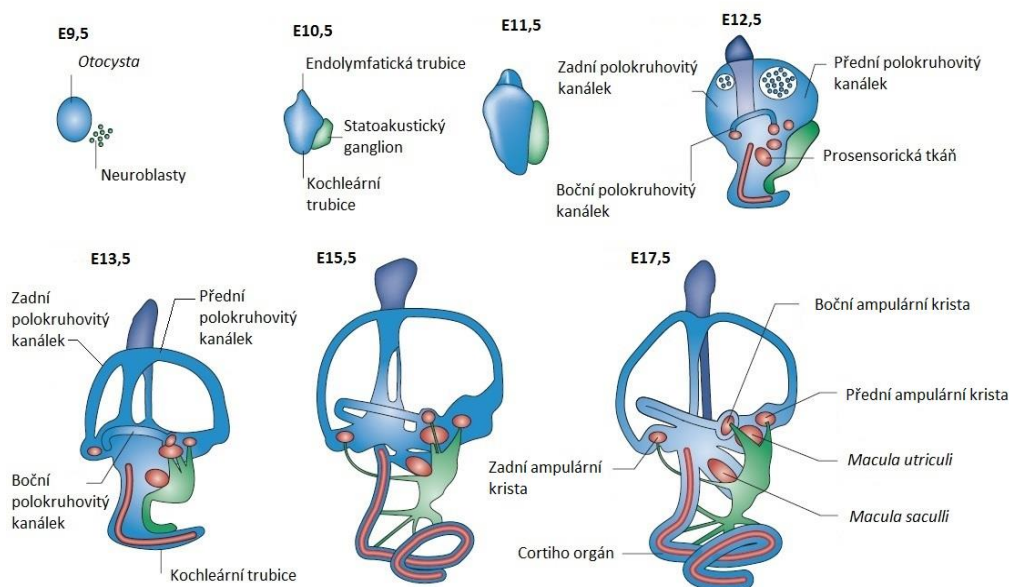
2.3 Morfologický vývoj vnitřního ucha myši

Vývoj vnitřního ucha během embryonálního vývoje lze rozdělit do tří hlavních stádií: 1) formování otického váčku, 2) formování kochleární trubice a diferenciaci buněk vestibulárního systému a 3) dokončení spiralizace kochleární trubice a dokončení proliferace ostatních orgánů vnitřního ucha. U myšičího embrya tato stádia probíhají ve věku embryonálních dní (E) E9,5-E10,5, E12,5-13,5 a E15,5-17,5.

V prvním stádiu embryonálního vývoje ucha dochází ke ztluštění neuroektodermu za vzniku sluchové ploténky, která se prohlubuje ve sluchovou jamku. Jejím dalším prohlubováním a konečným uzavřením vzniká otický váček, *otocysta* (Obr. 2.3, str. 19, E9.5).

Otický váček je uložen mezi ektodermem a stěnou zadního mozku (*robenceffalum*) v hlavovém mezenchymu. Dochází k delaminaci neuroblastů ze střední oblasti otického váčku a začíná se formovat statoakustický ganglion (Obr. 2.3, E9,5). Otický váček má zpočátku elipsoidní tvar, z něhož se posléze vychlipuje endolymfatická a kochleární trubice (Obr. 2.3, E11,5).

Dalším stádiem je vývoj a specifikace labyrintu. Z přední části *otocysta* vznikají tři polokruhové kanálky přední, zadní a boční a u jejich ústí do sluchového váčku se vytváří ampulární krystaly a senzorycký neuroepitel (Obr. 2.3, E12,5). Z ventrální stěny otického váčku vyrůstá slepý výběžek, který se otáčí dopředu a vzniká tak první otáčka kochleární trubice (Obr. 2.3, E12,5).



Obr. 2.3 Vývojová stádia vniřního ucha myši. Po uzavření *otocysta* dojde k delaminaci neuroblastů ze střední části oblasti otického váčku (E9,5). Od věku E10,5 dochází k formování endolymfatické trubice, kochleární trubice a statoakustického ganglionu. Následně ve věku E12,5 dochází k vývoji polokruhovitých kanálků, jejich prosenzorické tkáně a začíná spiralizace kochleární trubice. Ve věku E13,5 se dovyvíjejí polokruhové kanálky a kochleární trubice. Ve věku 15,5 až 17,5 dochází k dokončení spiralizace hlemýžďe na 2,5-2,75 závitů a proliferaci buněk ostatních orgánů ucha. Převzato a upraveno podle (Kelley, 2006).

Následně vzniká utrikulus, sakulus, Cortiho orgán a dochází k diferenciaci podpůrných a smyslových (vláskových) buněk (Obr. 2.3, E13,5). Centrální zbytek sluchového váčku se rozdělí řasovou vychlípeninou na dva oddíly: dorzální (utrikulus) a ventrální (sakulus). Na stěně centrální oblasti vzniká oblast s velmi vysokým epitelem

maculla acustica, jež se po dokončení vývoje sakulu a utrikulu rozdělí na *maculla saculli* a *maculla utriculi*. Epitel tvořící stěnu kanálu labyrintu prolifерuje, dochází k rozestupu jeho buněk, vzniká úzká štěrbin, která tvoří základ Cortiho tunelu. Z neuroektodermových buněk kostěného kanálku se diferencují buňky podpůrné a smyslové buňky Cortiho orgánu. V této fázi vývoje také dochází k rozdělení statoakustického ganglionu na menší *ganglion geniculi* a větší ganglion, jenž se člení na *ganglion vestibulare* a na *ganglion spirale cochleae*. *Ganglion vestibulare* inervuje sakulus, utrikulus a polokruhové kanálky a *ganglion spirale cochleae* inervuje kochleární labyrint. Z obou ganglií se diferencují bipolární nervové buňky, jejichž výběžky se napojí na smyslové buňky vnitřního ucha a jejich centrální výběžky *nervi vestibularia* a *nervi cochlearis* vrůstají do zadního mozku.

V posledním vývojovém stádiu vnitřního ucha již dochází pouze k dokončení spiralizace kochleární trubice na 2,5-2,75 závitů a proliferaci buněk ostatních orgánů vnitřního ucha (Obr. 2.3, E15,5-E17,5, str. 19) (Kelley, 2006, Vacek, 2006). K ukončení vývoje samotného Cortiho orgánu však dochází až v postnatální periodě, mezi desátým až čtrnáctým dnem po narození (Walters and Zuo, 2013).

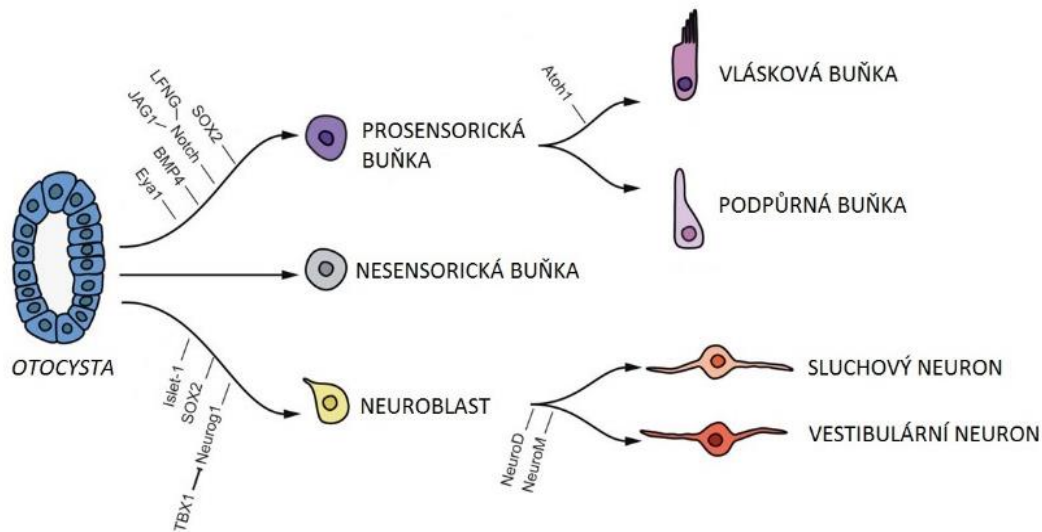
2.4 Specifikace buněk vnitřního ucha

Specifikace buněk je velmi složitý proces, který je ovlivňován mnoha faktory. Z progenitorových buněk otického epitelu dochází k formování tří linií buněk: proenzorické (budoucí vláskové a podpůrné buňky), proneurální (budoucí sluchové a vestibulární neurony) a nesenzorické (ostatní buňky otického váčku), (Obr. 2.4, str. 21) (Magarinos *et al.*, 2012).

2.4.1 Specifikace proenzorické tkáně

Proenzorické specifikace se účastní mnoho transkripčních faktorů. U většiny z nich ještě nebyla zcela objasněna jejich funkce. Prvním z nich je BONE MORPHOGENIC PROTEIN 4 (BMP4), který je exprimován v oblastech budoucích ampulárních krist a jeho role kvůli komplexnosti jeho působení v různých stádiích vývoje vnitřního ucha není plně objasněna (Li *et al.*, 2005, Pujades *et al.*, 2006). Bylo zjištěno, že tento signalizační protein hraje roli ve vývoji a diferenciaci buněk vnitřního ucha. Exogenní BMP4 vyvolává přeměnu prolifерujících buněk senzorkého epitelu na diferenciované senzorké buňky a ovlivňuje diferenciaci vláskových buněk v oblasti

neurosenzorického epitelu. Současně negativně ovlivňuje vývoj progenitorových buněk prostřednictvím negativní regulace LIM-homeodomenového transkripčního faktoru PAX2 (Li *et al.*, 2005).



Obr. 2.4 Specifikace buněk otického vřčku. Z otického vřčku (*otocysta*) dochází k formování 3 buněčných linií: prosenzorické, nesenzorické a neurální. Sluchové a vestibulární neurony jsou formovány z neuroblastů. Vlásokvé a podpůrné buňky se vytvářejí z prosenzorické tkáně. Formování těchto linií se účastní různé transkripční faktory a signální dráhy. Specifikace prosenzorické tkáně se účastní SOX2, Notch signalizační dráha prostřednictvím LFNG a JAG1, BMP4 a EYA1. Specifikace vlásokvých buněk se účastní zejména transkripční faktor ATOH1. Specifikace neurálních buněk je řízena transkripčními faktory ISLET1, SOX2, NEUROG1 a vlastní specifikace neuronů se účastní NEUROD a NEUROM. Převzato a upraveno podle (Magarinos *et al.*, 2012).

Důležitým specifikačním faktorem je „high mobility group“ (HMG) - box transkripční faktor SOX2. SOX2 je exprimován v proliferujících buňkách v prosenzorické doméně budoucích podpůrných buněk (Kiernan *et al.*, 2005, Neves *et al.*, 2007). U mutantních myši se sníženou expresí SOX2 byly prokázány defekty sluchu a rovnováhy a nedocházelo k diferenciaci vlásokvých ani podpůrných buněk (Kiernan *et al.*, 2005).

Další významnou skupinou mající vliv na vývoj prosenzorické tkáně jsou zástupci Notch signální dráhy. Notch signální dráha je komplexní dráha rozhodující o osudu buněk vnitřního ucha, včetně neuronů, vlásokvých a podpůrných buněk (Kiernan, 2013). Nejvýznamnějšími zástupci této signální dráhy ovlivňující vývoj vnitřního ucha jsou *Jagged1* (*Jag1*) a *Lunatic fringe* (*Lfng*). *Jag1* působí jako ligand

Notch dráhy a *Lfng* ovlivňuje aktivaci některých dalších ligandů této dráhy (Kelley, 2006). V oblasti kochleární trubice je velmi významná exprese JAG1. Je to jediný známý ligand Notch signální dráhy exprimovaný v proenzorické oblasti otického váčku a kompletní delece *Jag1* je pro embryo letální (Xue *et al.*, 1999). Při snížení exprese JAG1 dochází ke snížení počtu vláskových a podpurných buněk v oblasti Cortiho orgánu (Kiernan *et al.*, 2006). Existují čtyři hlavní geny Notch signální dráhy, jejichž nadbytek nebo inaktivace ovlivňuje vývoj proenzorické tkáně, ale výsledky výzkumu jsou zatím rozporuplné. Na jednu stranu bylo zjištěno, že při ektopické aktivaci Notch signalizace dochází ke zvýšení množství senzoričkových buněk v nesenzoričkové oblasti, to jest, že exprese jednoho z hlavních genů Notch signalizační dráhy NOTCH1 ve vláskové buňce ovlivňuje diferenciaci okolních buněk. Dále že v rané fázi vývoje ucha aktivace tohoto genu způsobuje formování proenzorického charakteru buněk (Daudet and Lewis, 2005). Navíc bylo zjištěno, že aktivace Notch dráhy v oblasti otického váčku embryí kura domácího snižuje expresi proenzorických markerů v celém otickém epitelu (Hartman *et al.*, 2010). V rozporu s těmito experimenty byly provedeny experimenty, které prokázaly, že ektopická aktivace Notch signalizační dráhy nezpůsobuje zvýšení počtu senzoričkových buněk v nesenzoričkové tkáni kochleární trubice a že Notch dráha tedy není nepostradatelná pro proenzorickou specifikaci v kochleární trubici (Basch *et al.*, 2011).

Vývoj vláskových buněk je nejvíce ovlivněný transkripčním faktorem ATOH1. Ten je exprimován ve všech buňkách senzoričkého epitelu vnitřního ucha a hraje klíčovou roli ve vzniku a vývoji vláskových buněk. Delece *Atoh1* vede ke kompletní ztrátě vláskových buněk. Absence proteinu ATOH1 vede ke snížení diferenciaci vláskových buněk (Bermingham *et al.*, 1999).

2.4.5 Specifikace neurální tkáně

Neurální specifikace začíná aktivací transkripčních programů exprese genů, kódujících proneurální transkripční faktory. Prvním z nich je NEUROGENIN1 (NEUROG1), jeho inaktivace způsobuje ztrátu neuronů senzoričkého ganglia, ale také způsobuje ztrátu a reorganizaci vláskových a podpurných buněk (Ma *et al.*, 2000, Ma *et al.*, 1998, Matei *et al.*, 2005). Tento faktor také aktivuje expresi dalších proneurálních genů *NeuroD* a *NeuroM*. U *NeuroD* deficientních myších embryí nebyl prokázán vliv

na proliferaci neuroblastů, ale došlo ke snížení množství vestibulárních a kochleárních neuronů (Liu *et al.*, 2000). U myšího modelu s kompletní delecí *NeuroD* byl prokázán jeho vliv na přežití diferencujících se sensorických neuronů (Kim *et al.*, 2001).

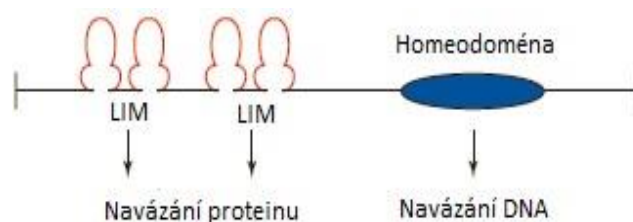
Dalším významným faktorem je SOX2, který je zejména exprimován v prozenzorické tkáni, ale jeho exprese je významná i v proneurální doméně. Exprese genu *Sox2* prakticky kopíruje expresi *Neurog1*, který má významný vliv na specifikaci neurální tkáně. Při snížení exprese SOX2 dochází k úbytku neuronů ve spirálním ganglionu (Puligilla *et al.*, 2010). Dalšími významnými faktory jsou GATA3, PAX2/8, TBX1, EYA1 a v neposlední řadě ISLET1.

2.5 PAX2

PAX2 neboli *Paired box gene 2* je transkripční faktor patřící do rodiny Pax. Tento faktor je dalším faktorem majícím podstatný vliv na embryonální vývoj vnitřního ucha (Nornes *et al.*, 1990, Torres *et al.*, 1996). PAX2 patří mezi první transkripční faktory aktivované v oblasti vytvářejícího se otického váčku. Objevuje se v mediální oblasti otického váčku již v době jeho formování a během dalšího vývoje je exprimován v endolymfatické trubici, vláskových buňkách veškeré diferenciované tkáně budoucích sensorických orgánů a v některých oblastech nesenzorické tkáně (Lawoko-Kerali *et al.*, 2002). V pozdějších fázích (E15,5-17,5) vývoje již *Pax2* není detekován v sensorických buňkách až na střední část *maculla utriculi* a zadní část *maculla sacculi*. V postnatálním vývoji se ale opět zvyšuje hladina exprese tohoto genu ve vláskových buňkách sensorické tkáně (Burton *et al.*, 2004).

2.6 ISLET1

ISLET1 patří mezi proteiny s LIM homeoboxovou doménou (LIM-HD). Jedná se o nadrodinu transkripčních faktorů hrajících významnou roli při buněčné diferenciaci a vytváření buněčné rozmanitosti během embryonálního vývoje. LIM-HD transkripční faktory jsou charakterizovány dva motivy zinkového prstu s LIM doménou pro interakce protein-protein a homeoboxovou doménou pro navázání na DNA (Obr. 2.5, str. 24) (Hobert and Westphal, 2000). LIM-HD proteiny se dělí do šesti skupin podle podobnosti jejich sekvence. Jednou z nich je i skupina ISLET, kam patří i ISLET1.



Obr 2.5 Schématická struktura LIM-HD proteinu. LIM domény interagují s proteiny a homeodoména se váže na DNA. Převzato a upraveno dle (Hobert and Westphal, 2000).

ISLET1 hraje významnou roli během embryonálního vývoje. Exprese *Islet1* byla prokázána v různých typech buněk a orgánů včetně slinivky břišní (Ahlgren *et al.*, 1997), srdce (Cai *et al.*, 2003), štítné žlázy, sítnice, podvěsku mozkového, centrálního a periferního nervového systému (Liang *et al.*, 2011, Pfaff *et al.*, 1996) a vnitřního ucha (Radde-Gallwitz *et al.*, 2004).

Exprese ISLET1 v nervovém systému byla detekována v mezodermální tkáni, ze které se posléze vyvíjejí interneurony centrální nervové soustavy. Bylo zjištěno, že se *islet1* (analog *Islet1*) účastní terminální diferenciaci neuronu u drozofily (Thor and Thomas, 1997). Dále bylo objeveno, že se *Islet1* nachází v mezodermální tkáni savců, ze které se posléze vyvíjejí interneurony centrální nervové soustavy a že je tento gen nezbytně nutný k terminální diferenciaci motorických neuronů. Bez jeho přítomnosti totiž dochází k apoptose buněk budoucích motorických neuronů. Při homozygotní delecí genu *Islet1* dochází k růstové degradaci u embryí ve věku E9,5 a letalitě u embryí věku E10,5 (Pfaff *et al.*, 1996). Důvodem této letality je ovlivnění exprese ISLET1 v srdci, kdy při globální delecí tohoto genu dojde k abnormálnímu srdečnímu vývoji, k jeho deformaci a nedotočení srdeční kličky. Snížením exprese ISLET1 dojde k poruše proliferace a migrace buněk a jejich apoptose (Cai *et al.*, 2003).

ISLET1 se v neposlední řadě účastní vývoje vnitřního ucha, avšak jeho vliv na vývoj tohoto orgánu nebyl zatím dostatečně prozkoumán. Bylo zjištěno, že ISLET1 je exprimovaný v buňkách otického váčku a spirálních gangliových neuronech v první fázi embryonálního vývoje vnitřního ucha. V této fázi mnoho buněk otického váčku proliferuje, což naznačuje, že tento transkripční faktor hraje velmi významnou roli v proliferaci sensorických a nesensorických progenitorových buněk (Huang *et al.*, 2008, Radde-Gallwitz *et al.*, 2004).

Během dalšího vývoje byla prokázána jeho exprese v oblasti diferencujících se vláskových a podpůrných buněk a byl exprimován také v buňkách primordiální oblasti vyvíjející se kochleární trubice. Účastní se tedy pravděpodobně vývoje vláskových buněk, podpůrných buněk a spirálních gangliových neuronů inervujících vláskové buňky (Huang *et al.*, 2008).

V další fázi embryonálního vývoje (E15,5-E17,5), kdy je již vývoj vestibulárních orgánů ukončen a zvyšuje se pouze počet diferencujících se vláskových buněk, klesá exprese ISLET1 ve vláskových buňkách a naopak se zvyšuje jeho exprese v buňkách podpůrných. Tyto změny v expresi ukazují, že pro diferenciaci vláskových buněk již jeho exprese není žádoucí.

Po kompletní diferenciaci vláskových buněk od vrchní části kochley k apexu je ISLET1 exprimovaný v převážně podpůrných buňkách. Ve vláskových buňkách je exprimován již jen ojediněle. Avšak je detekovatelný ve všech kochleárních epiteliálních buňkách. Expresse ISLET1 byla detekována i v postnatálním vývoji (P6) v podpůrných a gangliových buňkách (Huang *et al.*, 2008).

2.7 Myosin VIIa

Myosin VIIa patří do nadrodiny myosinových genů. Expresse Myosinu VIIa byla nalezena v různých strukturách tvořených epiteliálními buňkami během embryonálního vývoje a to zejména v epiteliálních buňkách, ve vnitřním uchu, v retinálním pigmentu epiteliálních buněk, v čichových receptorových neuronech, v ledvinách, v adrenálních žlázách a v játrech. Buňky všech těchto orgánů obsahují *microvilli*, jejichž struktura je založena na bázi aktinových filament. Ve vláskových buňkách jsou jimi stereocilie. Myosin VIIa tedy hraje roli v elongaci *microvilli* a stereociliích epiteliálních buněk během embryonálního vývoje. Expresse Myosinu VIIa byla detekována během vývoje vnitřního ucha v otickém váčku v první fázi vývoje vnitřního ucha. Dále byla jeho exprese prokázána ve vláskových buňkách kochleární trubice a vestibulárního systému (Hasson *et al.*, 1995, Sahly *et al.*, 1997). Slouží tedy jako marker vláskových buněk.

Cíle práce

Cíle mé diplomové práce byly:

- Zjištění funkční role ISLET1 při specifikaci neurosenzorových buněk vnitřního ucha během embryonálního vývoje za využití transgenního myšního modelu *Pax2/Is11*
- Popis fenotypu transgenní myši *Pax2/Is11*
- Porovnání exprese ISLET1 u nemutantních a *Pax2/Is11* transgenních embryí ve věku E10,5 a E13,5
- Zjištění počtu kopií genu *Islet1* vložených do genomu transgenních linií *Pax2/Is11-52* a *Pax2/Is11-300*

3 Experimentální část

3.1 Materiál

3.1.1 Chemikálie

Agarosa, Sigma-Aldrich, USA

BSA, Sigma-Aldrich, USA

Bromfenolová modř, Sigma-Aldrich, USA

Dihydrogenfosforečnan draselný, Penta, Česká republika

Dimehtylsulfoxid (DMSO), Sigma-Aldrich, USA

DPX „*Mountant for histology*“, Sigma-Aldrich, USA

dNTP Mix (10mM), Fermentas, USA

Dodecylsulfát sodný (SDS), Sigma-Aldrich, USA

„Eosin G o Y“ ethanolový roztok, Bamed, Česká republika

Ethidium bromid, Sigma-Aldrich, USA

Ethylakohol, Penta, Česká republika

DNA standard - GeneRuler 50 bp DNA Ladder, Fermentas, USA

Glycerol, Amresco, USA

Hematoxylin, Bamed, Česká republika

Hoechst 33258, Sigma-Aldrich, USA

Hydrogenfosforečnan disodný dodekahydrát, Penta, Česká republika

Chlorid draselný, Penta, Česká republika

Chlorid sodný, Penta, Česká republika

Izopropylakohol, Penta, Česká republika

Kozí sérum, Jackson ImmunoResearch, USA

Kyselina boritá, Sigma-Aldrich, USA

Kyselina chlorovodíková, Penta, Česká republika

Tissue-Tek® O.C.T. Compound, Electron Microscopy Sciences, USA

PAP pen, Sigma Aldrich, USA

Paraformaldehyd (PFA), Sigma-Aldrich, USA

RediLoad, Invitrogen Life Technologies, USA

Tween20, Amresco, USA

Voda bez DNas a RNas, Sigma-Aldrich, USA

Xylen, Penta, Česká republika

Xylencyanol FF, Sigma-Aldrich, USA

3.1.2 Enzymy

Proteinasa K (20 mg/ml), Sigma-Aldrich, USA

3.1.3 Protilátky

Protilátka	Druh protilátka	Hostitelský organismus	Typ protilátka	Společnost
anti-ISLET1	Primární	Myš	Monoklonální	Developmental Hybridoma Bank
anti-PAX2	Primární	Králík	Polyklonální	Covance
anti-Myosin VIIa	Primární	Králík	Polyklonální	Proteus Biosciences Inc.
DyLight 488	Sekundární	Koza	-	Jackson Immunoresearch
DyLight 594	Sekundární	Koza	-	Jackson Immunoresearch

3.1.4 Primery

Název	Sekvence 5'- 3'	Účel
<i>Pax2/Isl1-F</i>	AAGTTGAGTTTGAGAGGCGACACG	PCR, qPCR
<i>Pax2/Isl1-R</i>	TTGGCGCATTTGATCCCGTACAAC	PCR, qPCR
<i>Isl1-F</i>	GGGAGGATGGGCTTTTCT	qPCR
<i>Isl1-R</i>	AAGGGACTGAGAGGGTCTCC	qPCR
<i>Hprt1-F</i>	GTGGCCCTCTGTGTGCTC	qPCR
<i>Hprt1-R</i>	TCTACAGTCATAGGAATGGATCTATCA	qPCR

3.1.5 Komerční soupravy

Komerční souprava pro polymerasovou řetězovou reakci, JumpStart™ Taq DNA Polymerase, Sigma-Aldrich, USA

Komerční souprava pro kvantitativní polymerasovou řetězovou reakci, SYBR®Green JumpStart™ Taq ReadyMix™, Sigma-Aldrich, USA

3.1.6 Příprava roztoků

Antifade

(21,2 % (w/v) n-propylgalát, 2M Tris (pH = 8,0), 90 % (v/v) glycerol)

Bylo zahřátím rozpuštěno 21,2 mg n-propylgalátu ve 100 μ l 2M Tris pufru a následně bylo přidáno 900 μ l glycerolu. Roztok byl důkladně promíchán a uchováván při -20 °C.

Elektroforetický vzorkový roztok

(0,25 % (v/v) brofenolová modř, 0,25 % (v/v) xylencyanol FF, 30 % glycerol)

Bylo smíšeno 2,5 μ l bromfenolové modři, 2,5 μ l xylen cyanolu a 0,3 ml glycerolu, roztok byl doplněn destilovanou vodou na objem 1 ml.

Dodecylsulfát sodný 10% (w/v)

Bylo rozpuštěno 100,0 g dodecylsulfátu sodného v 1 000 ml destilované vody.

Elektroforetický pufr 0,5krát TBE

(45mM Tris, 45mM kyselina boritá, 1mM EDTA, pH = 8,0)

Byl připraven 10krát koncentrovaný zásobní roztok elektroforetického pufru. Bylo rozpuštěno 108,0 g Tris a 55,0 g kyseliny borité v 900 ml destilované vody. Poté bylo do roztoku přidáno 40 ml 0,5M Na₂EDTA o pH = 8,0. Roztok byl doplněn na objem 1000 ml. Pufr byl uchováván při pokojové teplotě a použit ve zředění 0,5krát.

Fosfátový pufr 1krát (PBS)

(10mM Na₂HPO₄, 150mM NaCl, 2mM KCl, 2mM KH₂PO₄, pH = 7,4)

Bylo rozpuštěno 80,0 g chloridu sodného, 2,0 g chloridu draselného, 35,8 g dodekahydrátu hydrogenfosforečnanu disodného a 2,4 g dihydrogenfosforečnanu draselného v 800 ml destilované vody. pH roztoku bylo upraveno pomocí kyseliny chlorovodíkové na pH = 7,4 a objem doplněn destilovanou vodou na 1 000 ml. Následně byl pufr sterilizován 20 minut v autoklávu Tuttnauer 3150EL při teplotě 121 °C, tlaku 101,5 kPa. Po sterilizaci byl uchováván při teplotě 4 °C.

Pracovní roztok pufru byl připraven zředěním zásobního roztoku fosfátového pufru 1krát, sterilizován v autoklávu Tuttnauer 3150EL za stejných podmínek a uchováván při teplotě 4 °C.

Kyselý ethanol

Ke 100 ml 96% (v/v) ethanolu byly přidány 4 kapky koncentrované kyseliny chlorovodíkové.

Lyzační pufr

(50mM Tris (pH = 8), 100mM EDTA (pH = 8), 100mM NaCl, 1% SDS, pH = 8,0)

Byly smíseny 2 ml 1M Tris o pH = 8,0 s 8 ml 0,5M EDTA o pH = 8,0. Do roztoku bylo poté přidáno 0,8 ml 5M chloridu sodného a 4 ml 10% (w/v) SDS. Objem roztoku byl doplněn destilovanou vodou na 40 ml. Roztok byl sterilizován filtrací přes sterilní filtr Milipore s póry 0,2 µm.

Paraformaldehyd 4% (w/v)

Byly rozpuštěny 4,0 g paraformaldehydu ve 100 ml PBS při teplotě 55 °C za stálého míchání.

Tris pufr 1M pH = 8,0

Bylo rozpuštěno 121,14 g tris(hydroxymethyl)aminomethanu v 800 ml destilované vody. pH pufru bylo pomocí kyseliny chlorovodíkové upraveno na pH = 8,0. Objem byl doplněn destilovanou vodou na 1 000 ml a pufr byl sterilizován 20 minut v autoklávu Tuttnauer 3150EL při teplotě 121 °C a tlaku 101,5 kPa.

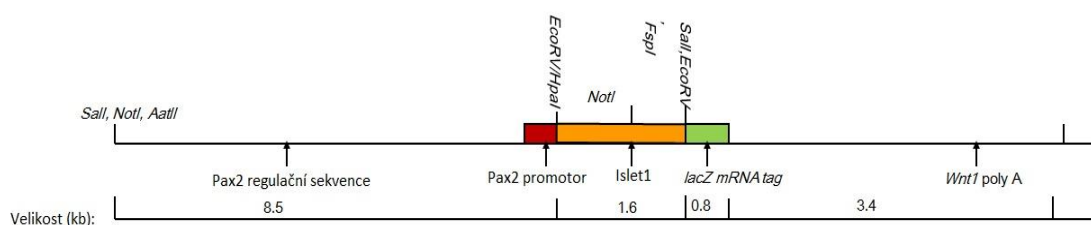
Zásobní roztok sérového albuminu (BSA) 2% (w/v)

Byly rozpuštěny 2,00 g BSA ve 100 ml vody bez Dnas a Rnas za stálého míchání. Po rozpuštění BSA byl roztok sterilizován filtrací přes sterilní filtr Milipore s póry 0,2 µm.

3.1.7 Modelový organismus

Jako modelový organismus byla použita myš domácí (*Mus musculus*). Transgenní myš *Pax2-Isl1* byla vytvořena za účelem zjištění důsledků navýšení exprese genu *Islet1* během vývoje vnitřního ucha. Navýšení exprese genu *Islet1* bylo zajištěno vložением genu *Islet1* pod *Pax2* promotor do 8,5 kb fragmentu z oblasti *Pax2* regulační sekvence tohoto genu viz Obr. 3.1, str. 31. Konstrukt regulační sekvence *Pax2* byl získán od skupiny dr. Rowitche (Rowitch *et al.*, 1999) a gen *Islet1* od skupiny Dr. Kappen (Muller *et al.*, 2003).

Konstrukt *Pax2-Isl1* byl vytvořen Dr. Pavlínkovou na univerzitě Nebraska Medical Center, USA. *Pax2-Isl1* konstrukt byl injikován do prvojádra zygoty imbredního myšního kmene FVB (číslo 207, Charles River). Tato vajíčka byla implantována do pseudobřezích samic (Cho *et al.*, 2009). Vzniklé linie byly genotypovány a následně byla analyzována exprese transgenu. Výsledkem byly 4 linie mutantních jedinců, u nichž byl transgen přenášen stabilně a nedocházelo k vymírání mutantních jedinců v linii. Následně byly vybrány dvě zástupné linie (*Pax2-Isl1/300* a *Pax2-Isl1/52*). Injikace transgenního konstruktů do prvojádra zygoty a genotypizace transgenních linií byly provedeny skupinou dr. Gabriely Pavlínkové ve spolupráci s „Mouse Genome Engineering Core Facility“ na univerzitě Nebraska Medical Center, USA.



Obr 3.1 Schéma *Pax2/Isl1* transgenu.

Se zvířaty bylo během experimentů nakládáno v souladu se zákonem č. 246/1992 Sb. ve znění jeho následných novel a vyhlášky č. 419/2012Sb.

3.1.8 Ostatní materiál

96 jamková destička na kvantitativní polymerasovou řetězovou reakci, Bio-Rad, USA

Millipore filtr s póry 0,2umExpressTM Plus, Millipore, USA

Optická fólie, Applied Biosystems, USA

Podložní skla SuperFrost/plus, Thermo Scientific, USA

(speciálním výrobním postupem upravený povrch skla pro elektrostatickou vazbu vzorků tkání a cytologických preparátů)

3.1.9 Přístroje

Analytické váhy 154AI, Bel engineering, Itálie

Autokláv (Parní sterilizátor) Tuttnauer 3150EL, Nizozemsko

BioEr, GenePro, Čína

Biorad CFX96, Bio-Rad, USA

Centrifuga Z216 MK, Hermle, Německo

Elektroforéza Mini Gel System B1, Owl Separation systems, Velká Británie

Fluorescenční mikroskop Nikon Eclipse E400, Nikon, Japonsko

Hybridizační pecProBlot, LabnetInternational, USA

Kryostat Leica CM1950, Leica, Německo

Mikrovlnná trouba MCE30, Hitachi, Japonsko

Pipety P39604P, Gilson, Labnet International, USA

Spektrofotometr N1000, NanoDrop Technologies, USA

Stereomikroskop SMZ 1500, Nikon, Japonsko

Stolní třepačka Vortex V-1 plus, Labnet International, USA

Stolní centrifuga FVL-2400N, Biosan, USA

Termoblok BioTDB-100, LabnetInternational, USA

Termostat Mini Incubator 5110-230V, LabnetInternational, USA

Vortex MIXER S0200, LabnetInternational, USA

pozn. veškeré použité laboratorní nádoby i roztoky jsou sterilní a bez RNas a DNas

3.1.10 Počítačové programy

Adobe Photoshop CS5.1, USA

Bio-Rad CFX Manager 3.0, USA

GraphPad Prism 5.04, GraphPad Software, USA

ImageJ 1.45s, National Institutes of Health, USA

LinRegPCR, Academic Medical Center, Nizozemsko

ND-1000 V.3.3.0, NanoDrop Technologies, USA

NIS Elements D 3.2, Nikon, Japonsko

3.2 Pracovní postupy

3.2.1 Izolace myších embryí

Embrya byla získávána ze dvou fenotypových linií. U linie *Pax2-Isl1/52* byli kříženi samci a samice heterozygotní pro alelu *Pax2-Isl1* na FVB definovaném pozadí za účelem získání homozygotní populace. U linie *Pax2-Isl1/300* byly kříženy samice heterozygotní pro alelu *Pax2-Isl1* se samci kmene FVB.

Myši byly připuštěny ke kopulaci a následující ráno byla provedena kontrola přítomnosti vaginálních zátek. Ty jsou tvořeny ze sekretu koagulačních žlázek samce a zabraňují odtoku spermatu z vagíny. V pochvě přetrvávají 16-24 hodin po kopulaci a pomáhají ke spolehlivému určení kopulace. Po nalezení vaginální zátky je poledne téhož dne obecně stanoveno jako E0,5 den březosti. Myši byly v poledne E10,5 dne a E13,5 dne březosti usmrceny cervikální dislokací. Z těla byla vyjmuta děloha a vložena do fosfátového pufru umístěného na ledu. Následně byla pod stereomikroskopem Nikon SMZ 1500 izolována jednotlivá embrya. Embryonální obal a část tkáně ocasu byly použity ke genotypizaci. Embrya byla vyfocena a na 1 min umístěna do Tissue-Tek média, aby se dostatečně nasýtla tímto médiem a při následném krájení nedocházelo k vypadávání tkáně z řezu. Embrya byla zamražena v Tissue-Tek médiu na suchém ledu a následně uchovávána při -80°C .

3.2.2 Izolace DNA

Izolace DNA je dvoudenní proces, při kterém je získána DNA z tkáně vysrážením z vodné fáze pomocí isopropanolu. Do sterilních mikrozkušavek obsahujících tkáň ocasu embrya a embryonální obal bylo přidáno 300 μl lyzačního pufru a 8 μl proteinasy K. Mikrozkušavky byly umístěny do hybridizační pece nastavené na teplotu 55°C a v ní inkubovány za rotace přes noc. Druhý den byly vzorky promíchány pomocí stolní třepačky, a poté odstředovány 12 minut při 18°C a 14 000 g v centrifuze Z216 MK. Následně byl supernatant opatrně přenesen do prázdných sterilních mikrozkušavek tak, aby se do špičky automatické pipety nedostala nelyzovaná tkáň, nacházející se na dně mikrozkušavky. K odebranému supernatantu bylo přidáno 300 μl isopropanolu a pomalým převrácením mikrozkušavky byla vysrážena DNA. Sedimentace DNA bylo docíleno odstředěním v centrifuze Z216

MK. Všechna následující odstředování probíhala po dobu 2 minut při 18 °C a 14 000 g. Supernatant byl odlit a k peletám bylo přidáno 500 µl 70% ethylalkoholu k jejich odsolení. Pelety DNA byly opatrným protřepáním uvolněny ze dna mikrokumavky, aby došlo k jejich dokonalému omytí. Po odstředění v centrifuze Z216 MK, byl supernatant opět odlit a k peletám bylo přidáno 500 µl absolutního ethylalkoholu k jejich odvodnění. Následovalo poslední odstředění v centrifuze Z216 MK a odlití ethylalkoholu. Získané pelety DNA byly vysušeny v termostatu při 55 °C. Po vyschnutí k nim bylo přidáno 40 µl vody bez Rnas a Dnas. DNA byly ponechány přes noc v termostatu při teplotě 55 °C, aby došlo k dokonalému rozpuštění pelety. Vzorky DNA byly poté uchovávány v lednici.

3.2.3 Stanovení koncentrace a čistoty DNA

Pro stanovení koncentrace a čistoty DNA byla změřena absorbance DNA pomocí spektrofotometru N1000 při 230, 260 a 280 nm a vyhodnocena pomocí počítačového programu ND-1000 V.3.3.0. Toto měření sloužilo ke zjištění koncentrace DNA (260 nm) a kvality DNA (230 a 280 nm). Pro zjištění kontaminace DNA proteiny sloužil poměr absorbcí (260 nm/280 nm). Tento poměr se vždy pohyboval v rozmezí hodnot 1,8-2,0, což vypovídá o čisté DNA bez kontaminace proteiny. Měření absorbance při 230 nm slouží ke zjištění kontaminace DNA organickými sloučeninami. Poměr absorbcí (260/230 nm) se rovněž pohyboval v rozmezí hodnot 1,8-2,0, což vypovídalo o DNA neznečištěné organickými látkami.

3.2.4 Genotypizace

3.2.4.1 Stanovení genotypu

Genotyp izolovaných embryí obou linií *Pax2-Isl1* byl určen pomocí polymerasové řetězové reakce (PCR) (Mullis *et al.*, 1986). Ke zjištění genotypu byly použity specifické primery pro detekci transgenu *Pax2-Isl1*. Byla změřena koncentrace a čistota DNA (viz kapitola 3.2.3). Následně byla vytvořena reakční směs pro PCR dle tabulky 3.1(str. 35). Reakční objem byl 25 µl.

Tabulka 3.1 Reakční směs PCR reakce

Chemikálie	Objem μl
PCR pufr 10×x koncentrovaný	2,5
MgCl ₂ (25μM)	1,5
<i>Pax2-Isl1</i> -F (10μM)	1
<i>Pax2-Isl1</i> -R (10μM)	1
DMSO	1,25
JumpStart™ Taq DNA polymerasa (2,5 u/μl)	0,15
dNTP (10μM)	0,5
RediLoad	2,5
Sigma H ₂ O	13,6
DNA	1

Mikrozkumavky byly umístěny do přístroje BioEr cykléru, kde byla DNA amplifikována dle tabulky 3.2. Reakce proběhla ve 35 cyklech.

Tabulka 3.2 Schéma PCR reakce

Kroky reakce	teplota °C	čas min
Iniciace denaturace	95	5:00
Denaturace DNA	95	0:30
Nasednutí primerů	63	0:30
Elongace řetězce	72	0:30
Konečná elongace	72	5:00

Produkty reakce byly detekovány pomocí horizontální gelové elektroforézy na 2% agarosovém gelu v 0,5krát zředěném TBE pufru a za přidání ethidiumbromidu (0,4 μg/ml). Vzorky byly napipetovány do jamek gelu po 8 μl a jako standard molekulových hmotností DNA byly použity 3 μl GeneRuler 50 bp DNA Ladderu. Elektroforetické rozdělení probíhalo při 130 V/cm po dobu 20 minut. Po rozdělení byly produkty detekovány pomocí UV záření a byl proveden fotografický záznam gelu.

3.2.4.2 Odlišení heterozygotů a homozygotů

U linie *Pax2-Isl1/52* byla zjištěna přítomnost transgenní alely pomocí standardní PCR reakce. K rozlišení homozygotních a heterozygotních jedinců byla použita metoda kvantitativní polymerázové řetězové reakce (qPCR) (Heid *et al.*, 1996) za použití specifických primerů pro detekci transgenní alely *Pax2-Isl1*. Jako kontrolní gen byl použit gen *Hprt1*.

Byla stanovena koncentrace a čistota DNA viz kapitola 3.2.3. DNA byla zředěna na koncentraci 50 ng/μl a poté byla znovu přeměřena její koncentrace. Složení reakční směsi je uvedeno v tabulce 3.3 pro oba dva geny. Do reakce bylo přidáno 50 ng DNA.

Tabulka 3.3 Reakční směs pro qPCR

Reagencie	Objem pro gen <i>Isl1</i> μl	Objem pro gen <i>Hprt</i> μl
SYBR®Green JumpStart™	10,00	10,00
Primer F (10μM)	0,25	0,25
Primer R (10μM)	0,25	0,25
DMSO	1,30	-
Destilovaná voda	doplněn na 20 μl	doplněn na 20 μl

Do přístroje Biorad CFX96 byla umístěna 96 jamková destička se vzorky, byla přikryta optickou fólií a byla spuštěna reakce dle tabulky 3.4. Reakce byla opakována ve 35 cyklech.

Tabulka 3.4 Schéma reakce qPCR

Kroky reakce	teplota °C	čas min
Iniciace denaturace	94	2:00
Denaturace DNA	94	0:15
Nasednutí primerů	57	0:30
Elongace řetězce	72	0:30
Závěrečná denaturace	65→95	0:05

Detekce produktů byla provedena za použití horizontální elektroforézy na 2% agarosovém gelu, do něhož byl přidán ethidiumbromid (0,4 µg/ml). Jako pufr byl použit 0,5krát zředěný elektroforetický TBE pufr. Jako standardu molekulových hmotností DNA byly použity 3 µl GeneRuler 50 bp DNA Ladderu. Elektroforetické rozdělení probíhalo při 13 V/cm po dobu 20 minut. Po skončení elektroforézy byly produkty vizualizovány pomocí UV záření a byl proveden fotografický záznam gelu.

Vyhodnocení qPCR bylo provedeno pomocí programu Bio-Rad CFX Manager 3.0, který stanovil hodnoty C_q, odpovídající cyklu, ve kterém dosáhne fluorescence vzorku prahové detekční hodnoty. Ke zjištění zygotnosti jedinců byla vypočítána hodnota změny ΔC_q dle vzorce:

$$\Delta Cq = Cq(\text{gen}) - Cq(\text{kontrolní gen}) [\text{cyklus}]$$

$$\Delta Cq = Cq(\text{Isl1}) - Cq(\text{Hprt}) [\text{cyklus}].$$

3.2.5 Příprava řezů z mražených tkání

Zamražená embrya byla krájena na kryostatu Leica CM1950, kdy teplota komory byla nastavena na -18 °C a teplota krájecí hlavy na -17 °C. Tloušťka řezů u embryí věku E10,5 byla 8 µm a u embryí věku E13,5 byla 10 µm. Jednotlivé řezy byly odebírány přímo na podložní skla SuperFrost/plus a uchovávány během krájení v komoře kryostatu. Každý pátý řez byl umístěn na sklíčko určené pro barvení hematoxylin-eosinem.

3.2.6 Histologické barvení hematoxylin-eosinem

Morfologie vnitřního ucha byla vyhodnocena pomocí barvení hematoxylin-eosinem. Obarvené řezy byly použity při vybírání vhodných řezů pro imunohistochemické barvení.

Skla s řezy byla ponechána při laboratorní teplotě 20 minut, následně byly řezy zkontrolovány pod mikroskopem, zda jsou dostatečně suché, a tím byla zajištěna vazba tkání na podložních sklech. Poté byly řezy omývány ve fosfátovém pufru při laboratorní teplotě po dobu 5 minut za použití třepačky nastavené na 75 ot/min. Po omytí byly řezy na sklech ohraničeny pomocí speciálního hydrofobního popisovače PAP pen a fixace řezů byla provedena na ledu za použití 4% paraformaldehydu po dobu 15 minut.

Následně byly řezy omývány ve fosfátovém pufru za laboratorní teploty 3krát po dobu 15 minut.

Řezy byly barveny roztokem hematoxylinu po dobu 1 minuty a poté vyprány pod proudem vody po dobu 5 minut. Intenzita probarvení jader byla zkontrolována pod mikroskopem. V případě nedostatečného obarvení bylo barvení a následné omytí řezů zopakováno. Odbarvení okolní tkáně bylo zajištěno omytím řezů v kyselém alkoholu po dobu 10 sekund. Řezy byly poté opět omývány v pramenité vodě po dobu 5 minut. Následovalo barvení řezů roztokem eosinu po dobu 5 sekund, a poté omytí destilovanou vodou.

Odvodnění řezů bylo provedeno ethanolovou odvodňovací řadou dle tabulky 3.5. Příliš intenzivně zbarvené řezy eosinem byly v 70% alkoholu ponechány déle, dokud nedošlo k optimálnímu probarvení tkáně. Probarvení tkáně bylo kontrolováno mikroskopicky. Posledním krokem histologického barvení bylo uzavření řezů do DPX média a přiložení krycího skla.

Tabulka 3.5 Schéma odvodnění řezů barvených hematoxylinem a eosinem

Chemikálie	Doba omývání min
Ethylalkohol 70%	doba je závislá na probarvení tkáně
Ethylalkohol 80%	0:10
Ethylalkohol 90%	0:10
Ethylalkohol 96%	0:10
Ethylalkohol 100%	5:00
Xylen 1	5:00
Xylen 2	5:00

3.2.7 Imunohistochemické barvení řezů mražených tkání

Bylo provedeno imunohistochemické barvení embryí věku E10,5 a E13,5 za použití nepřímé metody označení primárních protilátek sekundárními fluorescenčně značenými protilátkami. U embryí věku E10,5 bylo k detekci proteinů ISLET1 a PAX2 v oblasti otického vřáčku použito primárních protilátek anti-ISLET1 a anti-PAX2.

U embryí věku E13,5 bylo při barvení vestibulárního systému použito primární protilátky anti-MyosinVIIa k označení vláskových buněk, a primární protilátky anti-ISLET1 k detekci proteinu ISLET1. Při barvení basální části kochleární trubice u embryí věku E13,5 bylo použito primárních protilátek anti-ISLET1 a anti-PAX2 pro detekci proteinů ISLET1 a PAX2.

Skla s řezy mražené tkáně byla ponechána při laboratorní teplotě 20 minut, jejich dokonalé naschnutí na sklech bylo zkontrolováno pod mikroskopem. Následně byly řezy omývány 5 minut ve fosfátovém pufru za použití třepačky nastavené na 75 ot/min. Řezy byly ohraničeny pomocí speciálního hydrofobního popisovače PAP penou. Byla provedena fixace řezů na ledu za použití 4% paraformaldehydu. Následně byly řezy omývány ve fosfátovém pufru při laboratorní teplotě 3krát po dobu 15 minut v třepačce nastavené na 75 ot/min.

Dalším krokem byla blokace nespecifického navázání primárních protilátek. Byl připraven blokační roztok ve fosfátovém pufru dle tabulky 3.6. Blokace probíhala ve vlhké komůrce 30 minut za laboratorní teploty.

Tabulka 3.6 Blokační roztok

Reagencie	Množství % (v/v)
BSA	1
Kozí sérum	1
Tween	0,1

Následovala inkubace tkání s primárními protilátkami. Byla připravena reakční směs ve fosfátovém pufru dle tabulky 3.7 (str. 40) a řezy byly inkubovány s primárními protilátkami přes noc při 4 °C ve vlhké komůrce.

Další den byly řezy omývány 3krát po dobu 15 minut při laboratorní teplotě ve fosfátovém pufru v třepačce nastavené na 75 ot/min. Následovala inkubace ve vlhké komůrce za tmy s fluorescenčně značenými sekundárními kozími protilátkami ve fosfátovém pufru viz tabulka 3.7. Řezy byly následně omývány ve tmě 3krát po dobu 15 minut při laboratorní teplotě ve fosfátovém pufru.

Tabulka 3.7 Reakční směs pro inkubaci tkání s primárními protilátkami

Reagencie	E10,5 % (v/v)	Vestibulární systém E13,5 % (v/v)	Kochleární trubice E13,5 % (v/v)
BSA	1	1	1
Kozí sérum	1	1	1
Tween	0,1	0,1	0,1
Anti-ISLET1	0,5	0,5	0,5
Anti-PAX2	1	-	1
Anti-MyosinVIIa	-	0,2	-

Tabulka 3.8 Reakční směs pro inkubaci tkání s primárními protilátkami

Reagencie	Množství %(v/v)
BSA	1
Kozí sérum	1
Tween	0,1
DyLight 594	0,5
DyLight 488	0,5

Dalším krokem bylo barvení jader za použití barviva Hoechst (1 µg/ml). Řezy byly barveny při laboratorní teplotě za nepřístupu světla po dobu 15 minut v třepačce nastavené na 75 ot/min. Poté byly omývány 3krát po dobu 5 minut ve fosfátovém pufru za použití třepačky nastavené na 75 ot/min. Všechna třepání byla provedena při laboratorní teplotě.

Následně byly řezy odvodněny dle tabulky 3.5 (str. 38). Posledním krokem bylo uzavření řezů pomocí DPX (E10,5), přiložení krycího skla a uložení preparátů v lednici při teplotě 4 °C. Řezy E13,5 byly uzavřeny pomocí činidla antifade. Toto činidlo je mísitelné s vodou, a tak byly řezy přímo uzavřeny bez předchozího odvodnění tkáně. Preparáty byly uchovávány v lednici při teplotě 4 °C.

Výsledky všech imunohistochemických barvení byly upravovány v programu Adobe Photoshop CS5.1 a kvantitativně vyhodnocovány v programu ImageJ 1.45s.

3.2.8 Stanovení počtu kopií vloženého genu *Isl1* metodou qPCR

Pro stanovení počtu kopií genu *Isl1* u mutantních linií *Pax2-Isl1/52*, *Pax2-Isl1/300* a *wt* myši byla použita metoda kvantitativní polymerasové řetězové reakce (Heid *et al.*, 1996). Pro detekci alely genu *Isl1* byly použity specifické primery. Jako kontrolní gen byl použit gen *Hprt1*.

Byla stanovena koncentrace a kvalita DNA viz kapitola 3.2.3. DNA byla naředěna na koncentraci 20 ng/μl. Po naředění DNA byla znovu přeměřena její koncentrace. Byla napipetována reakční směs dle tabulky 3.9 pro oba dva geny stejná. Do reakce bylo přidáno 20 ng DNA.

Tabulka 3.9 Reakční směs pro qPCR

Reagencie	V pro gen <i>Isl1</i> μl	V pro gen <i>Hprt</i> μl
SYBR®Green JumpStart™	10,00	10,00
Primer F (10μM)	0,50	0,50
Primer R (10μM)	0,50	0,50
Destilovaná voda	doplněn na 20	doplněn na 20

Do přístroje Biorad CFX96 byla umístěna 96 jamková PCR destička překrytá optickou fólií a byla spuštěna reakce dle tabulky 3.10. Reakce byla opakována ve 40 cyklech.

Tabulka 3.10 Schéma reakce qPCR

Kroky reakce	teplota °C	čas min
Aktivace polymerázy	94	2:00
Denaturace DNA	94	0:15
Nasednutí primerů	55	0:30
Elongace řetězce	72	0:40
Závěrečná denaturace	65→95	0:05

Produkty byly detekovány za použití horizontální elektroforézy na 3% agarosovém gelu, do něhož byl přidán ethidiumbromid (0,4 μg/ml).

Jako elektroforetický pufr byl použit 0,5krát zředěný TBE. Jako standard molekulových hmotností DNA byly použity 3 µl GeneRuler 50 bp DNA Ladderu. Elektroforetické rozdělení probíhalo při 130 V. Po provedení elektroforézy byly produkty qPCR reakce detekovány pomocí UV záření a byl proveden fotografický záznam gelu.

K vyhodnocení qPCR byl použit program Bio-Rad CFX Manager 3.0, který stanovil hodnoty C_q. Data byla následně analyzována pomocí programu LinRegPCR. Poté byla vypočítána hodnota změny C_q normalizovaná ke kontrolnímu genu *Hprt* dle vzorce:

$$\Delta Cq = Cq(\text{gen}) - Cq(\text{kontrolní gen}) [\text{cyklus}]$$

$$\Delta Cq = Cq(\textit{Isl1}) - Cq(\textit{Hprt})[\text{cyklus}]$$

kde C_q je číslo cyklu, ve kterém dosáhne fluorescence vzorku prahové detekční hodnoty. ΔC_q bylo normalizováno ke genu *Hprt* jehož normalizovaný počet kopií je 2.

Počet kopií genu *Islet1* u obou linií byl vypočítán dle vzorce:

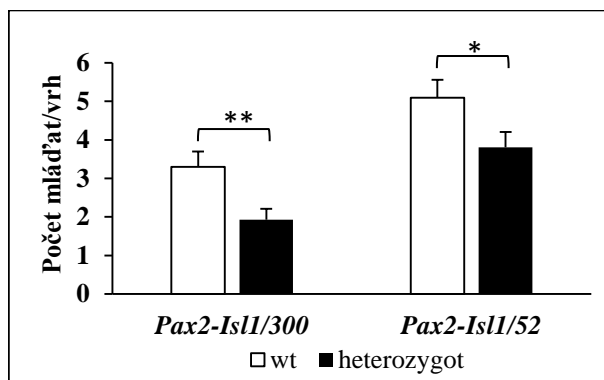
$$\text{Počet kopií} = 2^{(\Delta Cq(\text{wt}) - \Delta Cq(\text{heterozygot}))}$$

Číslo 2 značí počet kopií genu, které jsou u obou genů shodné. Hodnoty změn přechodových bodů ΔC_q (wt) a ΔC_q (heterozygot) byly vypočítány z průměrů C_q všech použitých vzorků wt a heterozygotů obou linií *Pax2-Isl1/52* a *Pax2-Isl1/300* (Schoen *et al.*, 2013).

4 Výsledky

4.1 Popis fenotypu myšního modelu *Pax2/Is11*

Transgenní myš *Pax2-Is11* byla vytvořena za účelem zjištění důsledků navýšení exprese genu *Islet1* na vývoj vnitřního ucha. Konstrukt transgenu *Pax2-Islet1* (viz.



Obr. 4.1 Porovnání průměrného počtu mládřat na vrh po odstavení od matky.

Průměrný počet heterozygotně mutantních jedinců na vrh oproti *wt* sourozencům je významně snížen u obou linií. Hodnoty představují průměr počtu jedinců na vrh \pm standardní směrodatná odchylka. Pro statistické vyhodnocení byl použit dvouvýběrový nepárový *t*-test. (*Pax2-Is11/300*: N=21 vrhů; *Pax2-Is11/52*: N=27 vrhů; **, $P < 0,01$; *, $P < 0,05$).

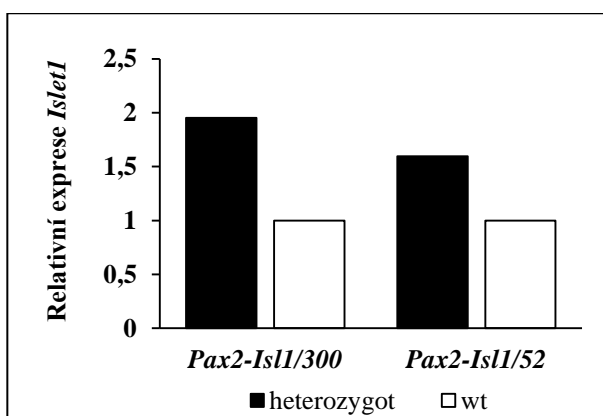
Obr. 3.1, str. 31) byl vložen do myšního genomu pomocí pronukleární injekce a následně genetické rekombinace. Byly získány dvě transgenní linie *Pax2-Is11/300* a *Pax2-Is11/52*.

Po odstavení mládřat od matky byl určen vliv transgenního genotypu na počet mládřat. Počet mládřat v rámci jednotlivých vrhů byl významně ovlivněn

transgenním genotypem (Obr. 4.1). Počet mutantních mládřat na vrh byl signifikantně menší než počet jejich nemutantních sourozenců (*wt*) jak u linie *Pax2-Is11/300* ($n = 21$ vrhů, $P < 0,01$), tak u *Pax2-Is11/52* ($n = 27$ vrhů, $P < 0,05$).

4.2 Stanovení počtu vložených kopií transgenu *Islet1*

Stanovení počtu vložených kopií transgenu *Islet1* bylo provedeno pomocí qPCR (kapitola 3.2.8.). Expresce genu *Islet1* u linie *Pax2-Is11/300* byla 2krát vyšší než u *wt* a u linie *Pax2-Is11/52* byla 1,5krát vyšší než exprese *Islet1* u *wt* (Obr. 4.2, str. 44). Hodnota exprese u *wt* odpovídá 2 kopiím genu *Islet1*. Počet celkových kopií genu *Islet1* je tedy u linie *Pax2-Is11/300* čtyři kopie a u linie *Pax2-Is11/52* tři kopie genu *Islet1*. U transgenní linie *Pax2-Is11/300* tedy byly vloženy dvě kopie transgenu *Islet1* u linie *Pax2-Is11/52* byla vložena jedna kopie do genomu (tabulka 4.1, str. 44).



Obr. 4.2 Relativní exprese genu *Islet1* u transgenních linií *Pax2-Is11/300* a *Pax2-Is11/52*.

Expres *Islet1* je navýšena u linie *Pax2-Is11/300* 2krát a u linie *Pax2-Is11/52* 1,5krát v porovnání s nemutantními jedinci. Hodnota *wt* odpovídá 2 kopiím genu *Islet1*. U linie *Pax2-Is11/300* byly vloženy 2 kopie transgenu *Islet1* a u linie *Pax2-Is11/52* 1 kopie transgenu *Islet1* do genomu.

Tabulka 4.1 Výpočet počtu vložených kopií transgenu *Islet1*

	wt	<i>Pax2/Is11-300</i>	<i>Pax2/Is11-52</i>
Relativní exprese <i>Islet1</i>	1	1,95	1,59
Celkový počet kopií genu <i>Islet1</i>	2	4	3
Počet vložených kopií transgenu <i>Islet1</i>	-	2	1

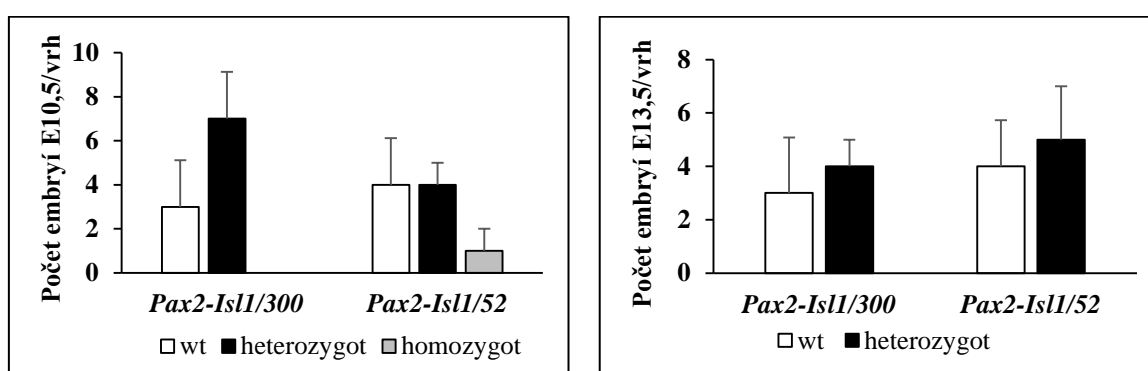
4.3 Vliv mutace na průměrné počty izolovaných embryí na vrh

Ve věku E10,5 bylo získáno celkem 18 embryí ze dvou vrhů linie *Pax2-Is11/300* a celkem 27 embryí ze tří vrhů linie *Pax2-Is11/52*. Ve věku E13,5 bylo získáno celkem 22 embryí ze dvou vrhů linie *Pax2-Is11/300* a celkem 27 embryí ze tří vrhů linie *Pax2-Is11/52*. Absolutní počty izolovaných embryí pro jednotlivé genotypy jsou uvedeny v tabulce 4.2 (str. 45). Srovnání průměrných počtů embryí na vrh u věků E10,5 a E13,5 ukazují, že v embryonálním věku nedochází ke snížení počtu mutantních jedinců oproti *wt* (Obr. 4.3, str. 45). U linie *Pax2-Is11/300* je nárůst počtu heterozygotně mutantních jedinců ve věku E10,5 ovlivněný malým vzorkem populace, proto tento nárůst neodpovídá genetickým předpokladům (1:1). Tyto výsledky ukazují, že snížení počtu mláďat po narození je ovlivněno letalitou postnatální nikoli letalitou embryonální.

Výjimkou je letalita homozygotně mutantních jedinců, ke které dochází již během embryonálního vývoje, kdy ve věku E13,5 již nebyla nalezena žádná homozygotně mutantní embrya (Obr. 4.3).

Tabulka 4.2 Absolutní počty izolovaných embryí

	celkem embryí	wt	heterozygot	homozygot	vrhy
E10,5 <i>Pax2-Isl1/300</i>	18	5	13	-	2
E10,5 <i>Pax2-Isl1/52</i>	27	12	12	3	3
E13,5 <i>Pax2-Isl1/300</i>	22	10	12	-	2
E13,5 <i>Pax2-Isl1/52</i>	27	12	15	-	3



Obr. 4.3 Průměrný počet izolovaných embryí na vrh ve věku E10,5 a E13,5. Hodnoty představují průměr počtu embryí na vrh \pm standardní směrodatná odchylka. Je patrná letalita homozygotně mutantních jedinců ve věku E10,5.

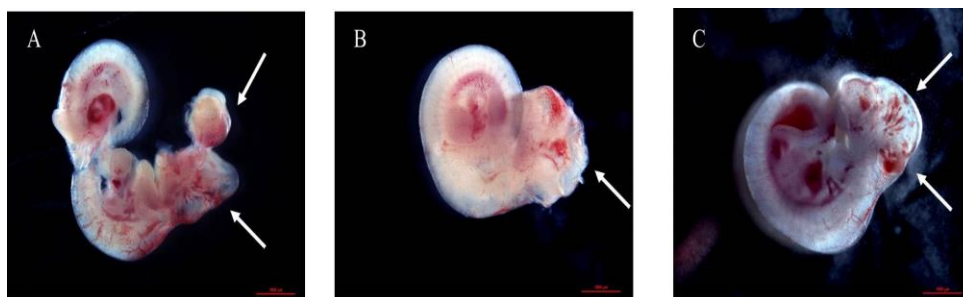
Potvrzení genotypu u homozygotů a heterozygotů bylo provedeno pomocí qPCR (tabulka 4.3). Při hodnotě ΔCq přibližně (-1,5) cyklu se jednalo o homozygotně mutantního jedince, pokud byla hodnota ΔCq kolem nuly jednalo se o heterozygotně mutantního jedince. V případě nemutantního jedince byla hodnota ΔCq kladná. Nebyl nalezen žádný homozygotní jedinec u embryí věku E13,5 (Obr. 4.3).

Tabulka 4.3 Odlišení homozygotních, heterozygotních a nemutantních jedinců linie *Pax2-Isl1/52*

Genotyp	ΔCq
wt	<0
heterozygot	~0
homozygot	~(-1.5)

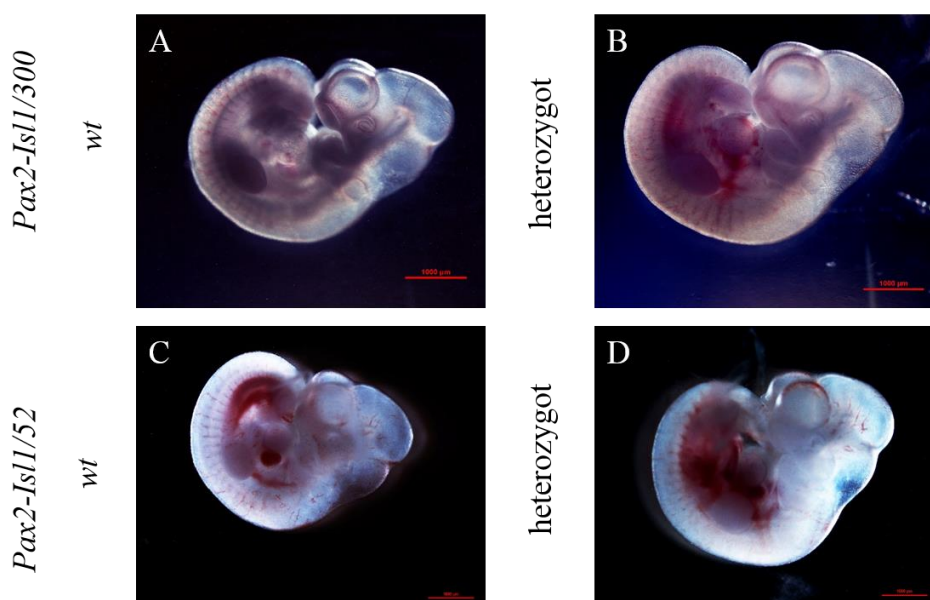
4.4 Fenotyp u izolovaných embryí

U heterozygotně mutantních jedinců nebyly nalezeny žádné externí morfologické rozdíly jak ve věku E10,5 (Obr. 4.5), tak ve věku E13,5 (Obr. 4.6, str. 47) u obou linií *Pax2-Isl1/300* i *Pax2-Isl1/52*. U *Pax2-Isl1/52* homozygotních embryí byl zjevný defektní vývoj. Byly zjištěny defekty neurální trubice (Obr 4.4 B), hematomy v oblasti vyvíjejícího se mozku (Obr. 4.4 C) a snížený růst jedince se zvýšenou nekrózou tkáně (Obr. 4.4 A).

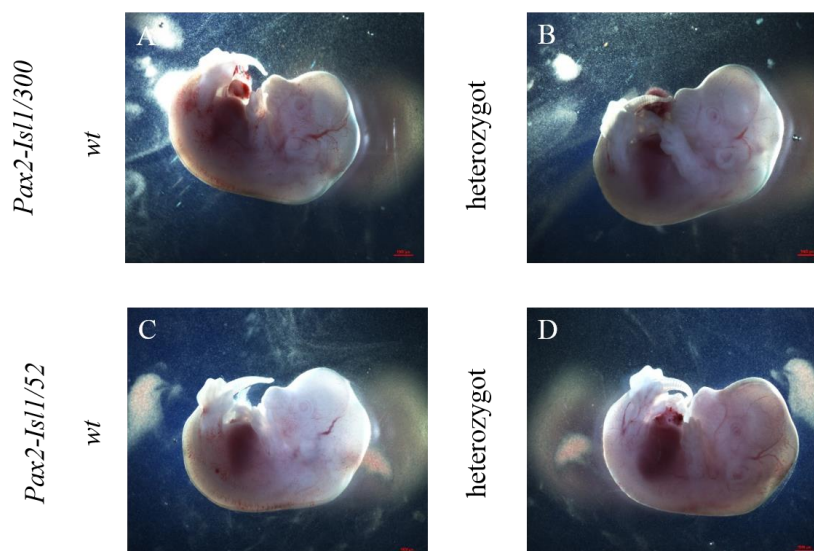


Obr 4.4 Defektní vývoj u *Pax2-Isl1/52* homozygotních embryí ve věku E10,5.

U homozygotních embryí byl potvrzen defektní vývoj. Jsou patrné hematomy vyvíjejícího se mozku (A, C), hematomy a zvýšené krvácení bylo viditelné i v jiných částech embrya, otevřená neurální trubice (B), a menší celkový růst se zvýšenou nekrózou (A). Šipky označují jednotlivá poškození. Měřítka představuje 1000 μm .



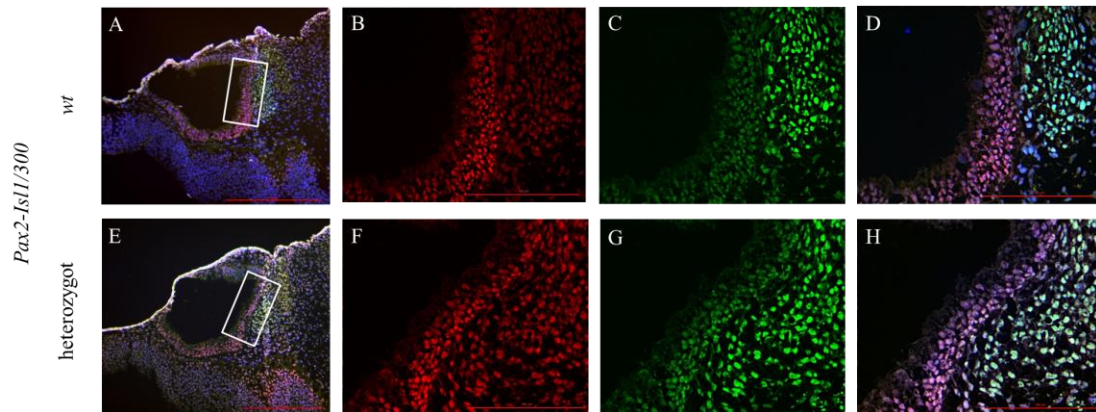
Obr. 4.5 Externí morfologie heterozygotních *Pax2-Isl1/300* a *Pax2-Isl1/52* embryí ve věku E10,5. Nejsou patrné žádné morfologické rozdíly mezi nemutantními (A, C) a heterozygotně mutantními (B, D) jedinci obou linií. Měřítka představuje 1000 μm .



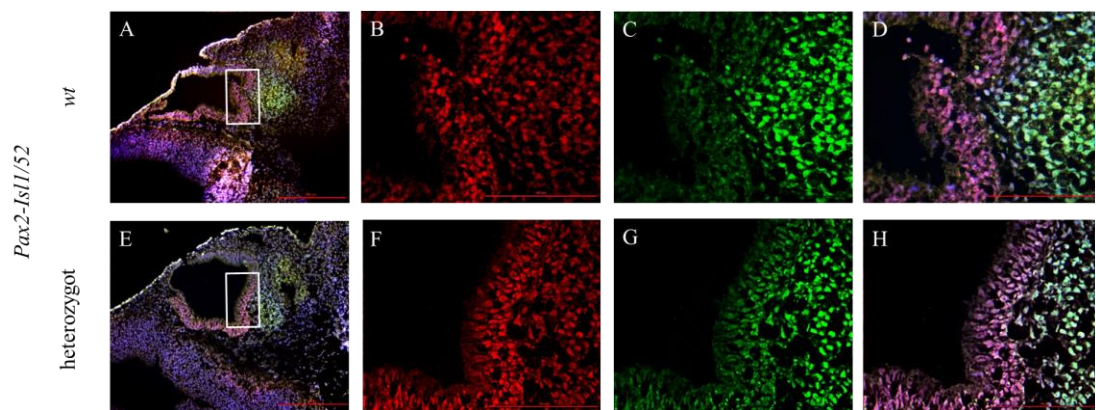
Obr. 4.6 Externí morfologie heterozygotních *Pax2-Isll/300* a *Pax2-Isll/52* embryí věku E13,5. Nejsou patrné žádné změny externího fenotypu u heterozygotně mutantních embryí. Měřítka představuje 1000 μm .

4.5 Expres ISLET1 v otickém váčku u E10.5 embryí

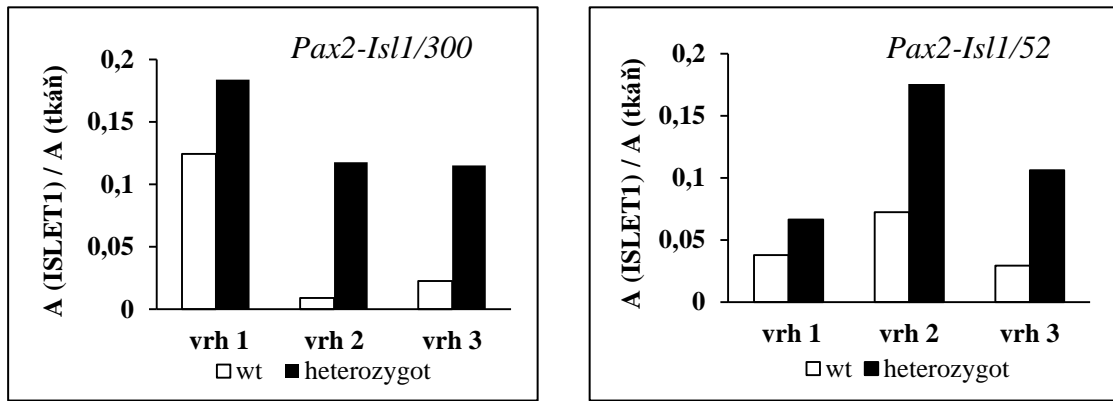
K posouzení změn exprese proteinu ISLET1 a morfologických změn během prvního stádia vývoje vnitřního ucha byly imunohistochemicky obarveny řezy embryí věku E10,5. Byl vždy porovnáván nemutantní a heterozygotně mutantní jedinec z jednoho vrhu. Celkem byla hodnocena tři embrya pro každý genotyp ze dvou vrhů linie *Pax2-Isll/300* a tři vrhů linie *Pax2-Isll/52*. U embryí věku E10,5 nebyly pozorovány žádné morfologické rozdíly mezi nemutantními a heterozygotně mutantními jedinci u obou transgenních linií *Pax2-Isll/300* (Obr. 4.7 A, E, str. 48) a *Pax2-Isll/52* (Obr. 4.8 A, E, str. 48). Byly však zjištěny rozdíly v expresi proteinu ISLET1 ve ventrální části otického epitelu, v oblasti u statoakustického ganglia, u linie *Pax2-Isll/300* (Obr. 4.7 C, G, str. 48) a linie *Pax2-Isll/52* (Obr. 4.8 C, G, str. 48). Při porovnání heterozygotně mutantních a *wt* sourozenců bylo zjištěno, že u heterozygotně mutantních jedinců linie *Pax2-Isll/300* dochází k velmi významnému navýšení exprese ISLET1 (Obr. 4.9, str. 49). U linie *Pax2-Isll/52* byl také zjištěn trend navýšení detekovaného signálu u heterozygotně mutantních jedinců ve srovnání s nemutantními jedinci (Obr. 4.9, str. 49). Nárůst exprese ISLET1 u heterozygotních embryí je znázorněn v detailu na Obr. 4.10 (str. 49). Expres ISLET1 byla vyšší u *Pax2-Isll/300* embryí v porovnání s *Pax2-Isll/52* embryi (Obr. 4.11, str. 50).



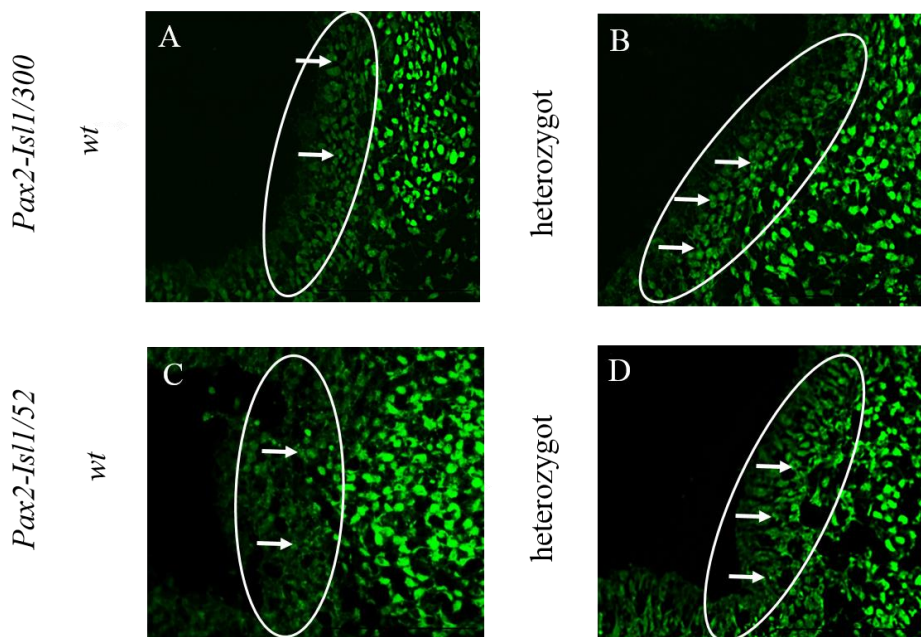
Obr. 4.7 Expres proteinů ISLET1 a PAX2 ve ventrální oblasti otického epitelu u E10,5 embryí linie *Pax2-Isl1/300*. U nemutantního embrya (obrázky A-D) a heterozygotně mutantního embrya (obrázky E-H) je imunohistochemicky detekována exprese ISLET1 a PAX2 v oblasti otického váčku. Na obrázcích A a E je oblast otického váčku ve věku E10,5; měřítko představuje 250 µm. Ve výřezu je označena oblast zvětšená na obrázcích B-D a F-H; s měřítkem 100 µm. Na obrázcích D, H je složený obraz exprese PAX2 (červený kanál), ISLET1(zelený kanál), jádra buněk jsou obarvená pomocí barviva Hoechst (modrý kanál).



Obr. 4.8 Expres proteinů ISLET1 a PAX2 ve ventrální oblasti otického epitelu u E10,5 embryí linie *Pax2-Isl1/52*. U nemutantního embrya (obrázky A-D) a heterozygotního mutantu (obrázky E-H) je imunochemicky detekována exprese ISLET1 a PAX2 v oblasti otického váčku. Na obrázcích A a E je oblast otického váčku ve věku E10,5; měřítko představuje 250 µm. Ve výřezu je označena oblast zvětšená na obrázcích B-D a F-H; s měřítkem 100 µm. Na obrázcích D a H je složený obraz exprese PAX2 (červený kanál), ISLET1(zelený kanál), jádra buněk jsou obarvená pomocí barviva Hoechst (modrý kanál).

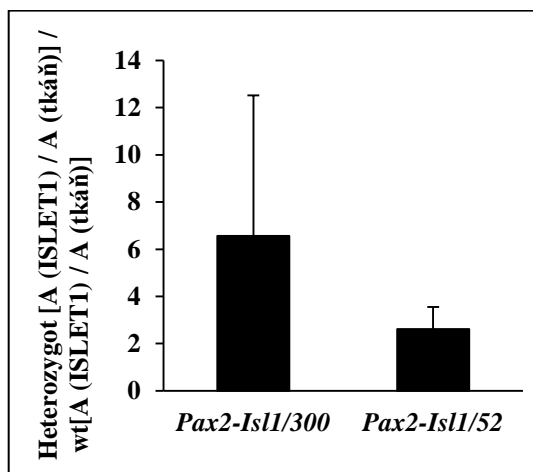


Obr. 4.9 Expresie ISLET1 ve ventrální oblasti otického váčku u linie *Pax2-Is11/300* a *Pax2-Is11/52*. Trend navýšení exprese ISLET1 je patrný u heterozygotních mutantů vzhledem k nemutantním sourozencům (*wt*) u všech tří hodnocených vrhů linie *Pax2-Is11/300* a linie *Pax2-Is11/52*. Expresie ISLET1 je vyjádřena jako poměr plochy exprese ISLET1 a celkové plochy tkáňe řezu. Bylo provedeno kvantitativní vyhodnocení signálu pomocí programu ImageJ 1.45s.



Obr. 4.10 Změna exprese ISLET1 ve ventrální oblasti otického váčku u transgenních linií *Pax2-Is11/300* a *Pax2-Is11/52* ve věku E10,5. Je patrné navýšení exprese ISLET1 u heterozygotně mutantních jedinců obou linií (šipky ukazují ISLET1 pozitivní buňky, obrázky B a D) v porovnání s *wt* sourozenci (obrázky A a C).

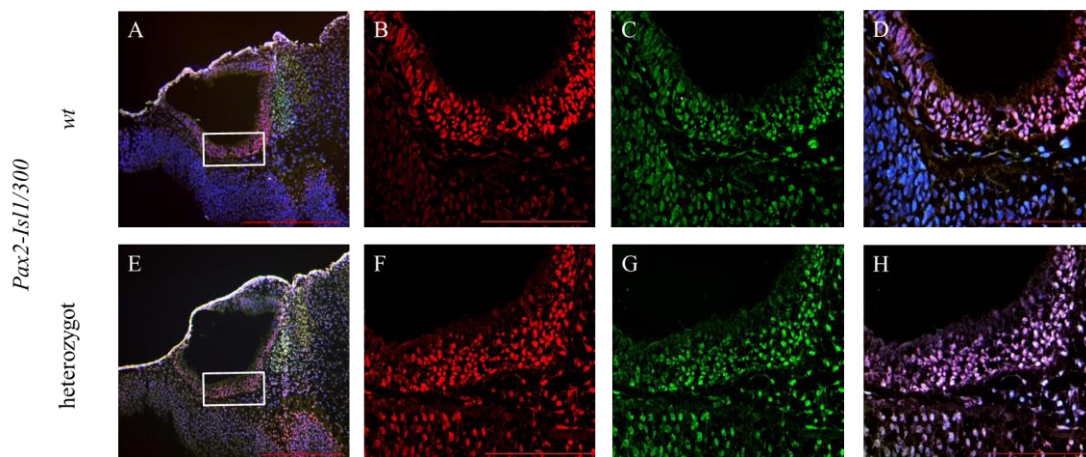
Dále byla sledována exprese ISLET1 v oblasti Pax2 domény otického epitelu, tj. v mediální oblasti otického epitelu, kde je silně exprimován PAX2. Imunohistochemické analýzy ukázaly navýšení exprese proteinu ISLET1 v oblasti



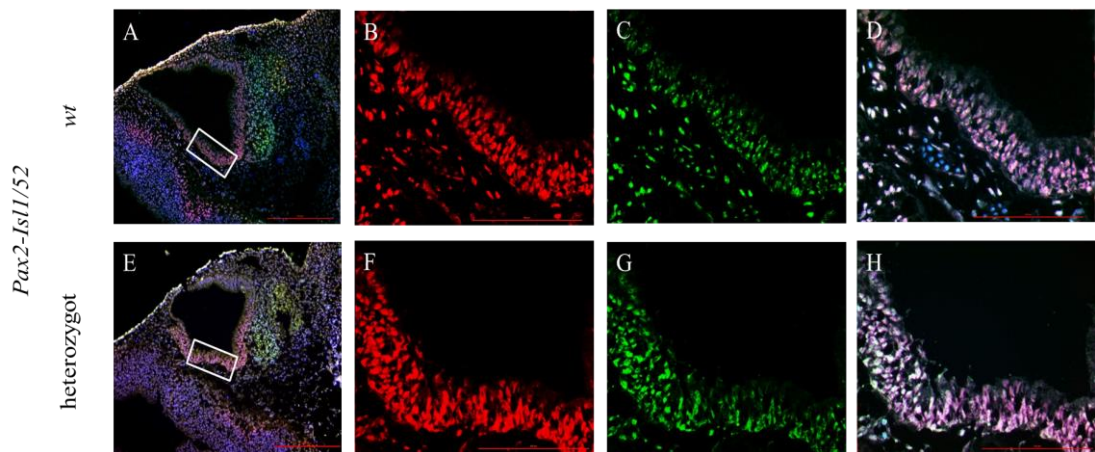
Obr. 4.11 Porovnání relativní exprese ISLET1 u heterozygotně mutantních embryí transgenních linií

Navýšení exprese ISLET1 u heterozygotních mutantů linie *Pax2-Is11/300* je mnohem vyšší než navýšení u heterozygotně mutantních embryí linie *Pax2-Is11/52*. Exprese ISLET1 je vyjádřena jako poměr plochy exprese ISLET1 k celkové ploše tkáně heterozygotního embrya ku ploše exprese ISLET1 k celkové ploše tkáně *wt* sourozence. Hodnoty představují průměr poměrů všech vrhů ± standardní směrodatná odchylka. Bylo provedeno kvantitativní vyhodnocení signálu pomocí programu ImageJ 1.45s.

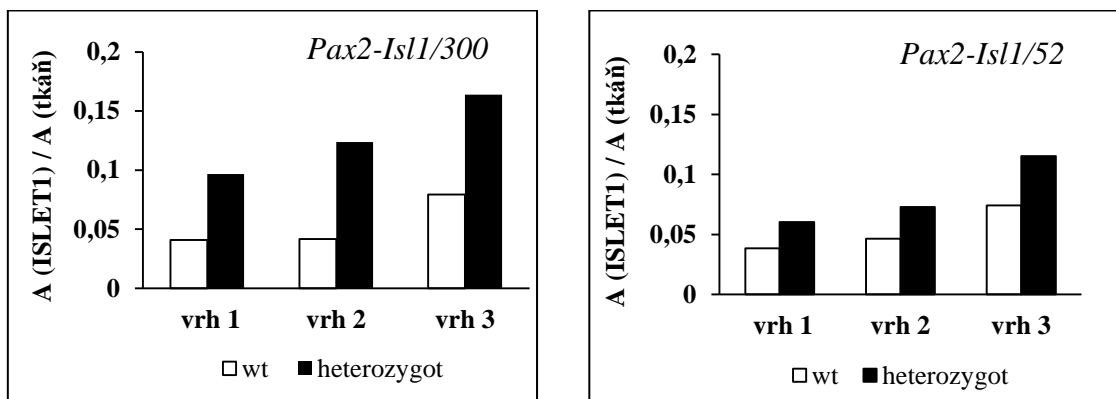
PAX2 domény jak u linie *Pax2-Is1/300* (Obr. 4.12, C a G), tak i u linie *Pax2-Is1/52* (Obr. 4.13, C a G, str. 51). Navýšení exprese ISLET1 v oblasti otického epitelu bylo zjištěno u všech heterozygotně mutantních jedinců obou linií v porovnání s *wt* sourozenci ve všech hodnocených vrzích (Obr. 4.14, str. 51). Porovnání exprese ISLET1 v otickém epitelu v oblasti exprese PAX2 mezi *Pax2-Is1/300* a *Pax2-Is1/52* transgenními embryi ukazuje navýšení exprese odpovídající zvýšenému počtu transgenních alel (Obr. 4.15 a 4.16, str. 52).



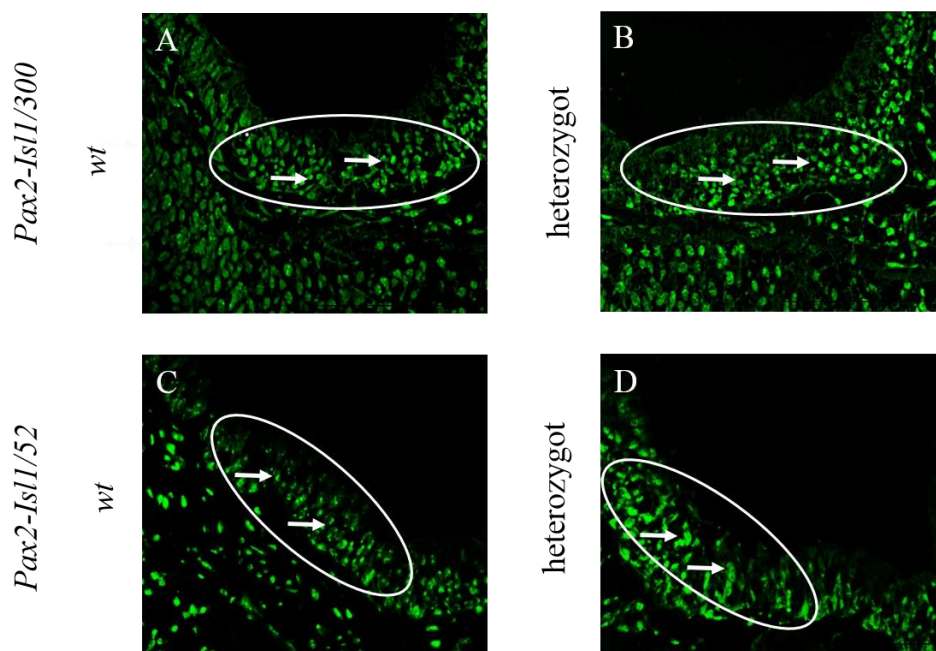
Obr. 4.12 Exprese proteinu ISLET1 a PAX2 v mediální části otického váčku u embryí ve věku E10,5 u linie *Pax2-Is1/300*. U nemutantního embrya (obrázky A-D) a heterozygotního mutantu (obrázky E-H) je imunochemicky detekována exprese ISLET1 a PAX2 v oblasti otického váčku. Na obrázcích A a E je oblast otického váčku ve věku E10,5; měřítko představuje 250 µm. Ve výřezu je označena oblast zvětšená na obrázcích B-D a F-H; s měřítkem 100 µm. Na obrázcích D, H je složený obraz exprese PAX2 (červený kanál), ISLET1 (zelený kanál), jádra buněk jsou obarvená pomocí barviva Hoechst (modrý kanál).



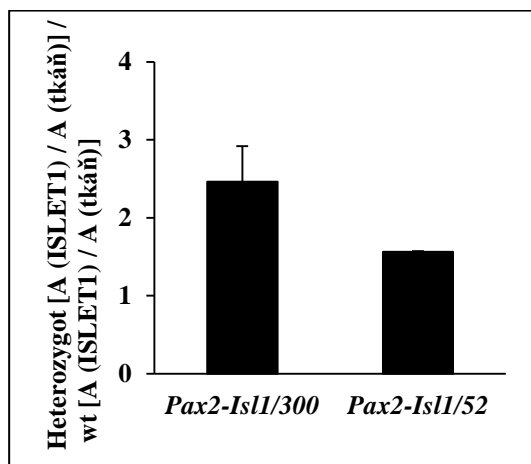
Obr. 4.13 Expresse proteinu ISLET1 a PAX2 v mediální oblasti otického váčku u embryí ve věku E10,5 u linie *Pax2-Is11/52*. U nemutantního embrya (obrázky A-D) a heterozygotního mutantu (obrázky E-H) je imunochemicky detekována exprese ISLET1 a PAX2 v oblasti otického váčku. Na obrázcích A a E je oblast otického váčku ve věku E10,5; měřítko představuje 250 μm . Ve výřezu je označena oblast zvětšená na obrázcích B-D a F-H; s měřítkem 100 μm . Na obrázcích D, H je složený obraz exprese PAX2 (červený kanál), ISLET1(zelený kanál), jádra buněk jsou obarvená pomocí barviva Hoechst (modrý kanál).



Obr. 4.14 Expresse ISLET1 v mediální oblasti otického váčku u linie *Pax2-Is11/300* a *Pax2-Is11/52*. Trend navýšení exprese ISLET1 je patrný u heterozygotních mutantů vzhledem k nemutantním sourozencům (*wt*) u všech tří hodnocených vrhů linie *Pax2-Is11/300* i linie *Pax2-Is11/52*. Expresse ISLET1 je vyjádřena jako poměr plochy exprese ISLET1 a celkové plochy tkáňe řezu. Bylo provedeno kvantitativní vyhodnocení signálu pomocí programu ImageJ 1.45s.



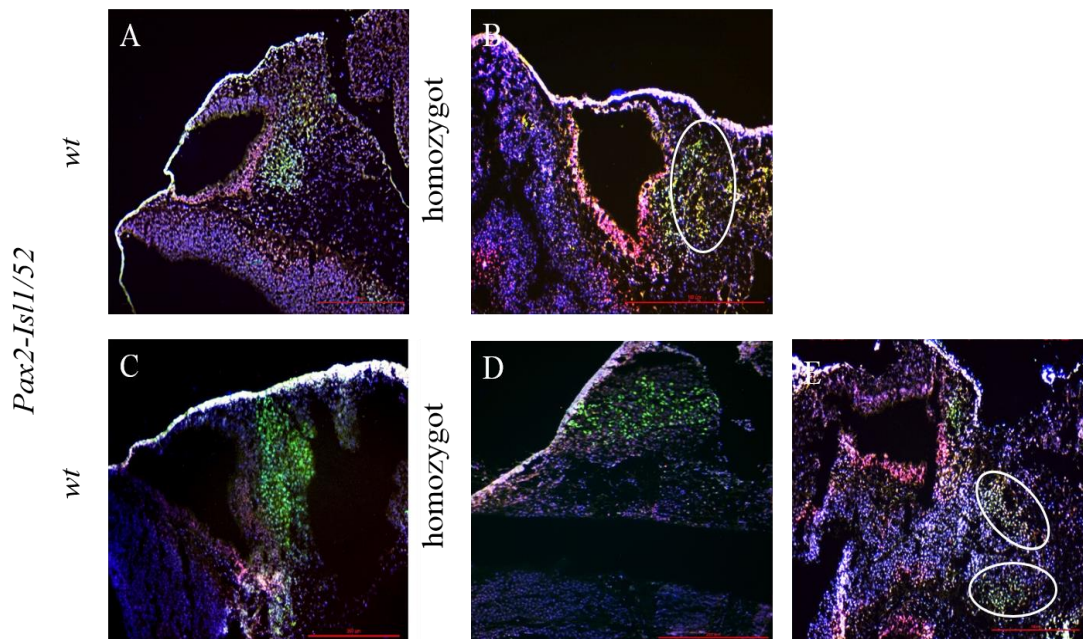
Obr. 4.15 Změna exprese ISLET1 u transgenních linií *Pax2-Is11/300* a *Pax2-Is11/52* v mediální oblasti otického vřívku u embryí ve věku E10,5. Je patrné navýšení exprese ISLET1 u heterozygotně mutantních jedinců obou linií (šípky ukazují ISLET1 pozitivní buňky, obrázky B a D) v porovnání s *wt* sourozenci (obrázky A a C).



Obr. 4.16 Porovnání navýšení exprese ISLET1 u heterozygotně mutantních jedinců transgenních linií. Navýšení exprese ISLET1 u heterozygotních mutantů linie *Pax2-Is11/300* je vyšší než navýšení u heterozygotně mutantních embryí linie *Pax2-Is11/52*. Expresa ISLET1 je vyjádřena jako poměr plochy exprese ISLET1 k celkové ploše tkáň heterozygotního embrya ku ploše exprese ISLET1 k celkové ploše tkáň *wt* sourozence. Hodnoty představují průměr poměru všech vrhů \pm standardní směrodatná odchylka. Kvantitativní vyhodnocení signálu bylo provedeno pomocí programu ImageJ 1.45s.

U linie *Pax2-Is11/52* byla zhodnocena morfologie a exprese proteinu ISLET1 u homozygotně mutantních embryí ve věku E10,5. Byl vždy porovnáván nemutantní a homozygotně mutantní jedinec ze stejného vrhu. Celkem byli zhodnoceni tři homozygotní jedinci ze dvou vrhů. Imunohistologické analýzy ukázaly velmi významné morfologické změny ve vývoji vnitřního ucha projevující se degenerací statoakustického ganglia (Obr. 4.17 B, E, str. 53). Dále byla detekována exprese ISLET1 u homozygotních mutantů v oblasti

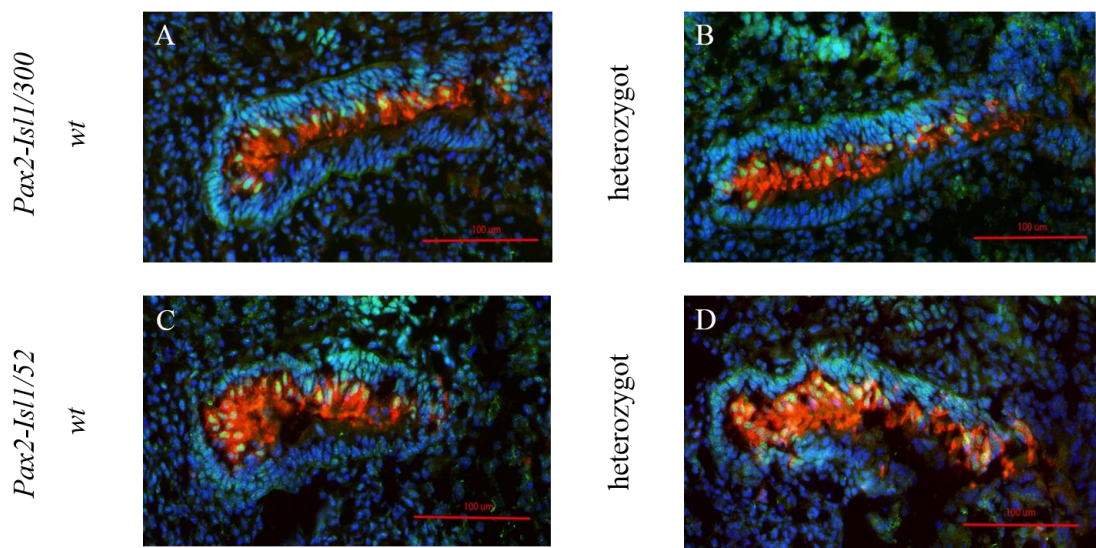
neurální trubice, kde ISLET1 není běžně exprimován (Obr. 4.17 E).



4.17 Morfologické změny a exprese ISLET1 u *Pax2-Isll/52* homozygotně mutantních E10,5 embryí. *Pax2-Isll/52* homozygotní embrya (B, D, E) a *wt* (A, C). Jsou patrné morfologické změny vývoje statoakustického ganglia (B), dále vlivem hematomu vzniklého během vývoje je patrné pouze statoakustické ganglium (D). Patrné je také navýšení exprese ISLET1 v oblastech, kde není běžně exprimován (E). Je detekována exprese PAX2 (červený kanál), ISLET1 (zelený kanál), jádra buněk jsou obarvena pomocí barviva Hoechst (modrý kanál). Měřítka představuje 250 μm .

4.6 Exprese ISLET1 ve vestibulárním systému embryí věku E13,5

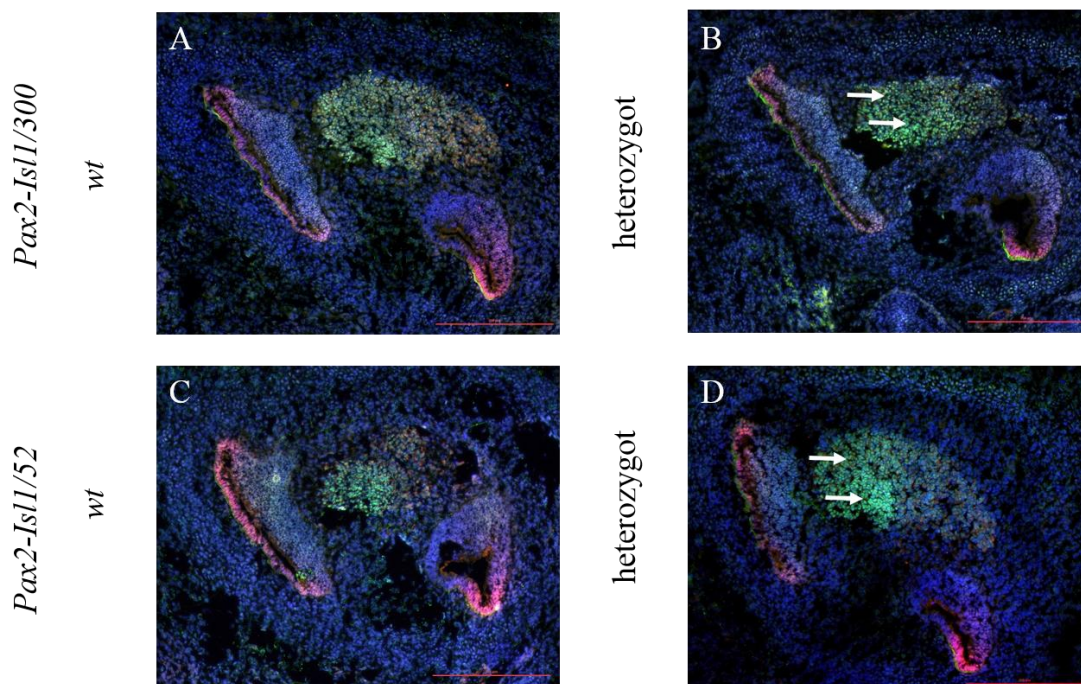
Expresa ISLET1 byla zhodnocena imunohistochemicky ve vestibulárním systému u E13,5 embryí. Byl vždy hodnocen jeden zástupce *wt* a jeden heterozygotně mutantní jedinec ze stejného vrhu a celkem byli hodnoceni jedinci ze tří vrhů. V souladu s publikovanými analýzami (Huang *et al.*, 2008, Radde-Gallwitz *et al.*, 2004), byl ISLET1 exprimován ve vláskových buňkách i v podpůrných buňkách sakuly, orgánu vestibulárního systému (Obr. 4.18, str. 54). Nebyly pozorovány žádné změny exprese ISLET1 ani morfologické změny v epitelu sakuly u transgenních embryí v porovnání s *wt* sourozenci (Obr. 4.18, str. 54).



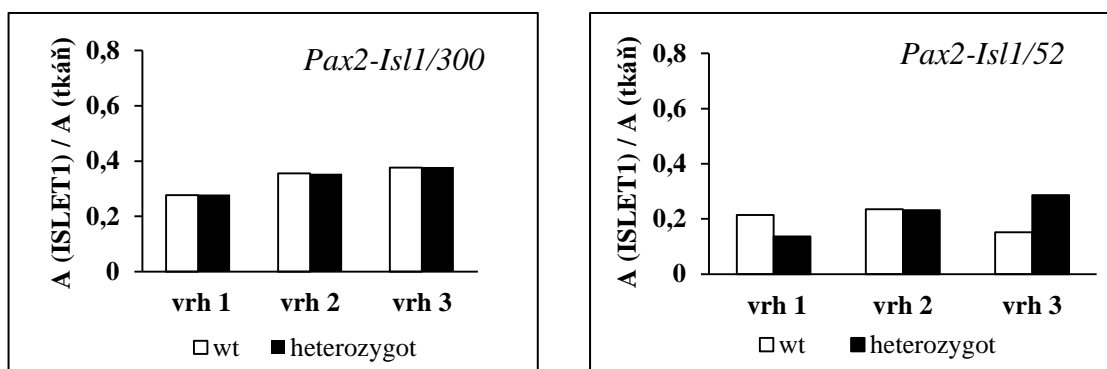
Obr 4.18 Sakulus vestibulárního systém u E13,5 embryí. Srovnávací imunohistochemické analýzy nemutantních (obrázky A a C) a *Pax2-Is11* heterozygotně mutantních embryí neukazují žádné expresní ani morfologické změny u mutantů obou linií, *Pax2-Is11/300* (B) a *Pax2-Is11/52* (D). Vlásokové buňky jsou označeny protilátkou anti-Myosin VII (červená), exprese ISLET1 (zelená), jádra buněk jsou barvena Hoechst (modrá). Měřítko představuje 100 μm .

4.7 Exprese ISLET1 v basální části kochleární trubice u embryí věku E13,5

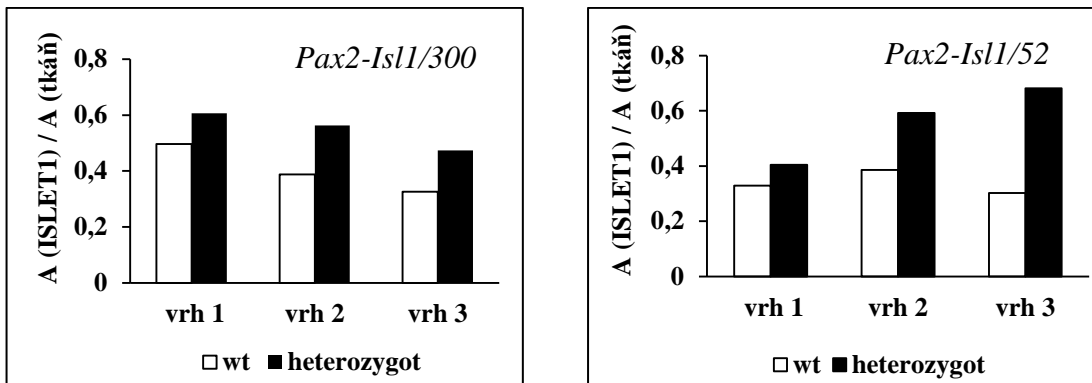
Exprese ISLET1 a morfologie byla hodnocena v oblasti basální části kochleární trubice a v oblasti *ganglion spirale cochleae*, tj v oblasti senzoričkových a neurálních buněk (Obr. 4.19, str. 55). V imunohistochemických analýzách bylo vždy porovnáno jedno nemutantní (*wt*) a jedno *Pax2-Is11* heterozygotně mutantní embryo ze stejného vrhu. Celkem byli hodnoceni jedinci ze dvou vrhů pro linii *Pax2-Is11/300* a tří vrhů pro linii *Pax2-Is11/52*. V oblasti basální části kochleární trubice nebyly pozorovány žádné morfologické ani expresní změny ISLET1 u obou linií, *Pax2-Is11/300* a *Pax2-Is11/52* (Obr. 4.20, str. 55). Naproti tomu v oblasti *ganglion spirale cochleae* byla exprese ISLET1 zvýšena u linie *Pax2-Is11/300* i u linie *Pax2-Is11/52* (Obr. 4.21, str. 56). Oblast *ganglion spirale cochleae*, je tvořena neurálními buňkami inervujícími kochleární trubici a ISLET1 je zde významně exprimován. Navýšení exprese ISLET1 bylo 1,5krát vyšší u obou linií (Obr. 4.22, str. 56).



Obr. 4.19 Basální část kochleární trubice u embryí věku E13,5. Srovnávací imunohistochemické analýzy nemutantních (obrázky A a C) a *Pax2-Isl1* heterozygotně mutantních embryí neukazují žádné morfologické změny u mutantů obou linií, *Pax2-Isl1/300* (B) a *Pax2-Isl1/52* (D). Je však pozorován expresní nárůst ISLET1 v oblasti *ganglion spirale cochleae* (šipky). Je znázorněna exprese PAX2 (červená), exprese ISLET1 (zelená) a jádra buněk jsou barvena Hoechst (modrá). Měřítko představuje 250 μm .

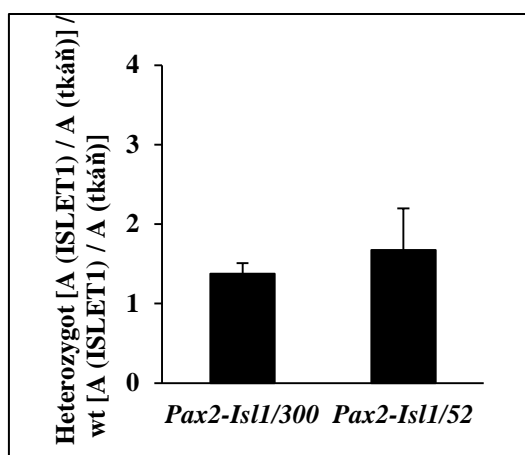


Obr. 4.20 Exprese ISLET1 v oblasti basální části kochleární trubice u transgenních linií. Exprese ISLET1 se neliší mezi nemutantními (*wt*) a heterozygotně mutantními jedinci všech tří pozorovaných vrhů linie *Pax2-Isl1/300* i linie *Pax2-Isl1/52*. Exprese ISLET1 je vyjádřena jako poměr plochy exprese ISLET1 a celkové plochy tkáňe řezu. Kvantitativní vyhodnocení signálu bylo provedeno pomocí programu ImageJ 1.45s.



Obr 4.21 Expres ISLET1 v oblasti *ganglion spirale cochleae* u transgenních linií.

Trend navýšení exprese ISLET1 je patrný u heterozygotních mutantů vzhledem k nemutantním sourozencům (*wt*) u všech tří hodnocených vrhů linie *Pax2-Is11/300* i linie *Pax2-Is11/52*. Změna exprese ISLET1 je vyjádřena jako poměr plochy exprese ISLET1 a celkové plochy tkáňe řezu. Kvantitativní vyhodnocení signálu bylo provedeno pomocí programu ImageJ 1.45s.



Obr 4.22 Porovnání navýšení exprese ISLET1 u heterozygotně mutantních jedinců transgenních linií.

Navýšení exprese ISLET1 u heterozygotních mutantů je stejné u obou dvou linií *Pax2-Is11/300* i *Pax2-Is11/52*. Expres ISLET1 je vyjádřena jako poměr plochy exprese ISLET1 k celkové ploše tkáňe heterozygotního embrya ku ploše exprese ISLET1 k celkové ploše tkáňe *wt* sourozence. Hodnoty představují průměr poměru všech vrhů \pm standardní směrodatná odchylka. Kvantitativní vyhodnocení signálu bylo provedeno pomocí programu ImageJ 1.45s.

5 Diskuze

ISLET1 je transkripčním faktorem exprimovaným během vývoje senzorické a neurální tkáně vnitřního ucha, ale jeho funkce není stále plně objasněna (Huang *et al.*, 2008, Radde-Gallwitz *et al.*, 2004). Pro studium funkce transkripčního faktoru je nejvýhodnější použití „*knock-out*“ modelu studovaného faktoru. Pro studium vlivu transkripčního faktoru ISLET1 na vývoj vnitřního ucha není možné tento model použít, protože ISLET1 velmi významně ovlivňuje vývoj neurální trubice (Pfaff *et al.*, 1996) a vývoj srdce (Cai *et al.*, 2003) a jeho delece tak způsobuje letalitu embryí ve věku E9,5-E10,5. Nejdůležitější část vývoje vnitřního ucha však probíhá až v pozdějších fázích vývoje (E12,5-E17,5) (Huang *et al.*, 2008, Radde-Gallwitz *et al.*, 2004). Jednou z možných alternativ „*knock-out*“ modelu jsou transgenní modely se sníženou nebo zvýšenou expresí. Pro určení vlivu ISLET1 v oblasti vyvíjejícího se vnitřního ucha byl v této práci použit transgenní model *Pax2-Isl1*, vytvořený vložením *Islet1* pod *Pax2* regulační sekvenci, a bylo tak předpokládáno navýšení exprese ISLET1. Regulační sekvence byla vybrána kvůli významnému vlivu transkripčního faktoru PAX2 na vývoj vnitřního ucha. PAX2 patří mezi první transkripční faktory aktivované v oblasti otického váčku a je přítomný ve všech stádiích vývoje vnitřního ucha (Burton *et al.*, 2004, Lawoko-Kerali *et al.*, 2002).

5.1 Fenotyp transgenního myšího modelu *Pax2-Isl1*

Byly vytvořeny dvě transgenní linie *Pax2-Isl1/300* a *Pax2-Isl1/52*. U obou transgenních linií byly zjištěny zhoršené sluchové funkce a zrychlené stárnutí sluchového ústrojí. Sluchové funkce byly měřeny v Laboratoři neurofyziologie sluchu prof. Syky v Ústavu experimentální medicíny, AV ČR. U obou linií byl určen sluchový práh na základě snímání sluchových odpovědí vyvolaných z mozkového kmene (ABR) a otoakustické emise (Pavlinkova, 2012). Tyto sluchové testy ukázaly, že u jedinců obou transgenních linií došlo k úplné ztrátě sluchu ve věku šesti měsíců. U transgenní linie *Pax2-Isl1/300* byl také zjištěn fenotyp poškození rovnováhy jedinců tzv. „*circling behavior*“ (Gibson *et al.*, 1995, Liu *et al.*, 2000). Jedná se o poruchu rovnováhy projevující se pohybem myši v kruhu. Při křížení linie *Pax2-Isl1/300* nebylo možné získat homozygotní populaci, protože heterozygotně mutantní samci nebyli schopni

samice oplodnit. U linie *Pax2-Isl1/52* nebylo detekováno poškození rovnováhy jedinců, tj. že nebyl významně poškozen vestibulární systém vnitřního ucha (Pavlinkova, 2012).

Při stanovení počtu vložených kopií transgenu *Islet1* byl zjištěn rozdíl mezi liniemi *Pax2-Isl/300* a *Pax2-Isl1/52*. U transgenní linie *Pax2-Isl1/300* došlo ke vložení dvou kopií transgenu a u linie *Pax2-Isl1/52* pouze k vložení jedné kopie transgenu *Islet1* (viz kapitola 4.8). Vložení transgenu probíhá náhodnou genetickou rekombinací, proto je možné docílit vložení rozdílného počtu kopií do genomu transgenních linií. Vložením jedné kopie transgenu dochází k poškození sluchového aparátu u obou linií. Přítomnost dvou kopií transgenu v genomu linie *Pax2-Isl1/300* způsobuje poškození rovnovážného systému a mnohem rozsáhlejší poškození sluchu u dospělých jedinců. Vliv počtu vložených kopií *Islet1* byl již dříve zkoumán v rámci studia vlivu hypomorfní mutace *Islet1* na vývoj motorneuronů míchy a byl funkčně prokázán vliv množství vložených kopií genu *Islet1* do genomu jedinců (Liang *et al.*, 2011).

Při porovnání počtu mutantních a nemutantních embryí během embryonálního vývoje nebyly zjištěny rozdíly, ale počet *Pax2-Isl1/52* a *Pax2-Isl1/300* transgenních mláďat po jejich odstavení od matky byl významně snížen v porovnání s nemutanty. U heterozygotně mutantních jedinců tedy dochází k postnatální letalitě jedinců obou linií. U obou kmenů může být úbytek transgenních mláďat způsoben dvěma příčinami buď nedokončením vývoje sacího reflexu mláďete, tzn. že mláďe není schopno sát, nebo je mláďe matkou odvrženo z důvodů neschopnosti komunikace a rozpoznání mláďat matkou. Přesné stanovení příčin úhynu mláďat po narození je velmi obtížné, ale naše výsledky ukazují, že *Pax2-Isl1* mutanti mají zhoršené sluchové funkce, tj. zhoršené schopnosti komunikace.

5.2 Embryonální letalita homozygotní mutace jedinců transgenní linie *Pax2-Isl/300* a *Pax2-Isl1/52*

Letalita homozygotně mutantních jedinců linie *Pax2-Isl/300* nemohla být studována, protože při křížení linie *Pax2-Isl1/300* nebylo možné získat homozygotní populaci. Heterozygotně mutantní samci nebyli schopni samice oplodnit vlivem poškození rovnovážného systému.

Při porovnávání fenotypu embryí linie *Pax2-Isl1/52* byly zjištěny defekty homozygotně mutantních jedinců, které byly ve věku E10,5 letální. Morfologické a imunohistochemické analýzy ukázaly změny ve vývoji homozygotních mutantů. Jednalo se hlavně o poškození vyvíjejícího se mozku a defekty neurální trubice. Imunohistochemické analýzy ukázaly velmi významné morfologické změny projevující se degradací statoakustického ganglia a rozsáhlé změny exprese proteinu ISLET1 v oblastech, v nichž tento protein není běžně exprimován (Obr. 4.17, str. 53). ISLET1 byl silně exprimován v PAX2 pozitivních oblastech, zejména v oblasti neurální trubice. U homozygotního mutantu došlo tedy k navýšení exprese ISLET1 u PAX2 pozitivních buněk, což negativně ovlivnilo embryonální vývoj, zejména vývoj neurální trubice a mozku a vedlo k letalitě embryí.

5.3 Morfologické a expresní změny ISLET1 v oblasti otického vřčku u embryí stáří E10,5

V prvním stádium vývoje vnitřního ucha, odpovídajícímu embryonálnímu věku E9,5-E10,5, dochází prodlužováním a uzavíráním sluchové jamky ke vzniku otického vřčku a posléze k delaminaci neuroblastů ze střední oblasti otického vřčku. Začíná se také formovat statoakustický ganglion u střední oblasti otického vřčku (Kelley, 2006, Vacek, 2006). V tomto stádiu vývoje vnitřního ucha je exprese ISLET1 detekována v oblasti statoakustického ganglia a ventrální části otického vřčku (Huang *et al.*, 2008, Radde-Gallwitz *et al.*, 2004). V této práci byla studována změna exprese ISLET1 u dvou oblastí otického vřčku, ve ventrální oblasti otického vřčku (vzhledem k pozici neurální trubice), tj. oblasti u statoakustického ganglia, a v oblasti domény exprese PAX2, mediální části otického vřčku.

U heterozygotních *Pax2-Isl1/300* a *Pax2-Isl1/52* embryí ve věku E10,5 bylo detekováno navýšení exprese ISLET1 v oblasti otického vřčku u statoakustického ganglia. Dále byla detekována zvýšená exprese ISLET1 v oblasti PAX2 domény otického vřčku. Navýšení exprese ISLET1 u transgenních embryí potvrdilo původní předpoklad, že vložení kopie genu *Islet1* pod *Pax2* regulační sekvenci povede k expresi ISLET1 v PAX2 pozitivních buňkách a tedy k celkovému navýšení ISLET1 exprese. Navíc byl prokázán statisticky významný rozdíl navýšení exprese ISLET1 v oblasti PAX2 domény otického vřčku u heterozygotně mutantních jedinců *Pax2-Isl1/300*

v porovnání s navýšením exprese ISLET1 u heterozygotně mutantních jedinců *Pax2-Isl1/52*. Významnější navýšení exprese ISLET1 u heterozygotů *Pax2-Isl1/300* je způsobeno dvojnásobným počtem vložených kopií transgenů *Islet1* oproti liniím *Pax2-Isl1/52*. V oblasti PAX2 domény navíc poměr navýšení exprese ISLET1 mezi transgenními liniemi odpovídal poměru počtu vložených kopií do genomu transgenních linií.

5.4 Morfologické a expresní změny ISLET1 u embryí věku E13,5

V druhém stádiu vývoje odpovídajícímu věku embryí E12,5-E13,5 vznikají utrikulus a sakulus, orgány rovnovážného systému (Kelley, 2006). Během tohoto období vývoje probíhá také diferenciací vláskových a podpůrných buněk těchto orgánů (Sahly *et al.*, 1997) a dochází k formování kochleární trubice (Kelley, 2006). Diferenciací vláskových a podpůrných buněk probíhá až v pozdějším věku E15,5-E17,5. Exprese ISLET1 byla detekována v sakulu vestibulárního systému, v basální části kochleární trubice a v neurálních buňkách *ganglion vestibulare* inervujících vestibulární systém a *ganglion spirale cochleae* inervujících kochleární trubici (Huang *et al.*, 2008, Radde-Gallwitz *et al.*, 2004). V této práci byla u transgenních embryí ve věku E13,5 porovnávána morfologie a exprese ISLET1 v oblasti sakulu, orgánu vestibulárního systému, v oblasti basální části kochleární trubice a v neurálních buňkách *ganglion spirale cochleae*.

U sakulu byla potvrzena exprese ISLET1 jak ve vláskových, tak v podpůrných buňkách tohoto orgánu. Nebyly však zjištěny žádné expresní ani morfologické změny u transgenních embryí. Exprese transkripčního faktoru PAX2 se výrazně snižuje v diferenciováných buňkách vestibulárního systému. Jeho exprese byla sice částečně prokázána v oblasti vláskových buněk vestibulárního systému, nicméně po diferenciaci těchto buněk dochází k jejímu snížení (Torres *et al.*, 1996). Také expresní profil *Pax2-Isl1* transgenů v našem modelu odpovídá snížené expresi genu *Pax2* ve vestibulárním systému embryí věku E13,5, poněvadž nebylo detekováno navýšení exprese ISLET1.

K navýšení exprese PAX2 dochází až v postnatálním vývoji, zatím ale byla detekce PAX2 provedena pouze u kura domácího ve věku P7-P21 (Warchol and Richardson, 2009). Vzhledem k poruchám rovnovážného ústrojí detekovaným v postnatálním vývoji u linie *Pax2-Isl1/300* je možné, že v pozdějších stádiích vývoje dochází k aktivaci transkripčního faktoru PAX2 a tudíž by mohlo dojít i ke změně expresního profilu transgenu *Pax2-Isl1*. Tato hypotéza bude předmětem dalšího studia.

V oblasti basální části kochleární trubice nebyly pozorovány žádné morfologické ani expresní změny ISLET1, přestože transkripční faktor PAX2 je silně exprimován v oblasti diferencujících se vláskových a podpurných buněk kochleární trubice embryí (Burton *et al.*, 2004). Žádné významné zvýšení exprese ISLET1 nebylo detekováno u *Pax2-Isl1/300* ani u *Pax2-Isl1/52* transgenních embryí. Jedním z důvodů může být neaktivní 8,5 kb fragment *Pax2* regulační sekvence, použitý u *Pax2-Isl1* transgenu, v buňkách kochleární trubice v tomto embryonálním věku. Předchozí studie ukázaly aktivitu 8.5 kb fragmentu *Pax2* regulační sekvence v oblasti vnitřního ucha ve věku E10,5 (Rowitch *et al.*, 1999), čemuž odpovídají i naše studie u transgenních embryí věku E10,5. V pozdějším věku však již nebyla zkoumána aktivita tohoto regulačního segmentu a je tedy možné, že není aktivní a dochází tedy k „vypnutí“ transgenu, což by odpovídalo našim ISLET1 expresním výsledkům.

Transkripční faktor ISLET1 je velmi významně exprimován v gangliových buňkách vnitřního ucha během celého embryonálního vývoje (Huang *et al.*, 2008, Radde-Gallwitz *et al.*, 2004) a také transkripční faktor PAX2 je v této fázi vývoje silně exprimován v neurálních buňkách vnitřního ucha (Torres *et al.*, 1996), což naznačuje, že oba tyto transkripční faktory mají velmi významnou roli při diferencování gangliových buněk *ganglion spirale cochleae*. U transgenních embryí bylo detekováno navýšení exprese ISLET1 v oblasti gangliových buněk inervujících basální část kochleární trubice v porovnání s expresí u nemutantních embryí ve věku E13,5. Vložení kopie *Islet1* do genomu tedy může vést k narušení specifikace a diferenciaci neurálních buněk inervujících kochleární trubici a k poškození sluchu, které může být způsobeno poškozením přenosu vzruchu přes neurální buňky sluchového aparátu. Tato hypotéza bude také předmětem dalšího studia.

5.5 Odůvodnění projevů fenotypu transgenního modelu *Pax2-Isl1* obou linií

Do genomu linie *Pax2-Isl1/300* byly vloženy dvě kopie transgenu *Pax2-Isl1*. U dospělých jedinců bylo zjištěno poškození sluchového aparátu a poruchy rovnovážného systému projevující se jako „circling behavior“ fenotyp. V oblasti kochleární trubice u embryí ve věku E13,5 byly nalezeny žádné morfologické ani expresní změny ISLET1. Jediné expresní změny byly detekovány v oblasti neurální buněk *ganglion spirale cochleae*, inervujících kochleární trubici, kde dochází k navýšení exprese ISLET1. U dospělých jedinců dochází k úplné ztrátě sluchu ve věku šesti měsíců. Důvodem tohoto poškození může být narušení správné diferenciaci sensorických buněk v pozdějších fázích vývoje sluchového aparátu nebo přerušení správného přenosu signálu nervového vzruchu kvůli možnému poškození inervace sluchového aparátu.

U této linie dále dochází k poruchám rovnovážného systému tzv. „circling behavior“. Byl zjištěn nárůst exprese ISLET1 v oblasti otického epitelu v E10.5, ze kterého se posléze formují orgány vestibulárního systému. Tento nárůst odpovídal počtu vložených kopií transgenu *Pax2-Isl1*. Avšak u embryí ve věku E13,5 nebyly nalezeny žádné morfologické ani expresní změny ISLET1 v oblasti vyvíjejícího se sakulu, orgánu rovnovážného systému. I přesto je ale možné předpokládat, že prvotní změny vedly k funkčnímu poškození rovnovážného systému. K poškození tohoto systému ale může docházet až během postnatálního vývoje vestibulárního systému, kdy se obnovuje vliv transkripčního faktoru PAX2 na vestibulární systém (Warchol and Richardson, 2009), a může tak dojít k opětovné aktivaci transgenu *Pax2-Isl1*. Dalším důvodem může být přerušení správného přenosu signálu nervového vzruchu kvůli možnému poškození inervace rovnovážného systému. Molekulární mechanismy poškození vestibulárního a sluchového aparátu budou předmětem dalších studií.

Do genomu linie *Pax2-Isl1/52* byla vložena pouze jedna kopie transgenu *Pax2-Isl1*. Fenotyp se u dospělých jedinců projevuje úplnou ztrátou sluchu ve věku šesti měsíců. V oblasti kochleární trubice u embryí ve věku E13,5 nebyly nalezeny stejně jako u linie *Pax2-Isl1/300* žádné morfologické ani expresní změny ISLET1. Jediné expresní změny byly detekovány v oblasti neurálních buněk *ganglion spirale cochleae*, inervujících kochleární trubici, kde dochází k navýšení exprese ISLET1.

Důvodem tohoto poškození může být tedy stejně jako u linie *Pax2-Isl1/300* narušení správné diferenciaci sensorických buněk v pozdějších fázích vývoje sluchového aparátu nebo přerušení správného přenosu signálu nervového vzruchu kvůli možnému poškození inervace sluchového aparátu. Tyto hypotézy budou dále předmětem studia.

6 Závěr

Tato práce byla zaměřena na studium funkční role ISLET1 během neurosensorového vývoje vnitřního ucha. V rámci této práce bylo zjištěno:

- Do genomu transgenních linií byly vloženy:
Pax2/Isl1-300 – 2 kopie transgenu *Islet1*
Pax2/Isl1-52 – 1 kopie transgenu *Islet1*
Vložení kopie transgenu *Pax2-Isl1* do genomu způsobuje defekty sluchového aparátu. Vložení druhé kopie transgenu u linie *Pax2-Isl1/300* způsobuje kromě defektů sluchového aparátu také poruchy rovnovážného aparátu projevující se jako tzv. “circling behavior”.
- Byla zjištěna zvýšená letalita heterozygotně mutantních jedinců v postnatálním období u obou linií.
- U homozygotní mutace linie *Pax2-Isl1/52* dochází k letalitě embryí ve věku E10,5. Letalita je zřejmě způsobena defekty vývoje neurální trubice, kde byla zjištěna exprese ISLET1 v oblasti neurální trubice, kde tento protein není běžně exprimován.
- Navýšení exprese ISLET1 u obou linií u embryí ve věku E10,5:
 1. v oblasti ve ventrální části otického váčku, tj u statoakustického ganglia
 2. v oblasti domény exprese PAX2 otického váčku, kde navýšení odpovídá počtu vložených kopií transgenu.
- Změna exprese ISLET1 ve vláskových a podpůrných buňkách vestibulárního systému vnitřního ucha nebyla detekována u embryí stáří E13,5 ani u jedné z transgenních linií.
- V oblasti basální části kochleární trubice u embryí stáří E13,5 nebyl zjištěn rozdíl v expresi ISLET1 ani u jedné z transgenních linií.
- U obou transgenních linií bylo detekováno navýšení exprese ISLET1 v oblasti *ganglion spirale cochleae* u embryí ve věku E13,5. K navýšení dochází v oblasti neurálních buněk, mezi liniemi nebyl zjištěn významný rozdíl v míře navýšení.

- Bylo potvrzeno, že ISLET1 je transkripčním faktorem ovlivňujícím vývoj vnitřního ucha a že zvýšením embryonální exprese ISLET1 pomocí transgenu *Pax2-Isl1* dochází k ovlivnění fenotypu a funkčním změnám sensorických orgánů vnitřního ucha. Výsledky studia budou základem pro další studium.

Citace

- Ahlgren, U., Pfaff, S. L., Jessell, T. M., Edlund, T. and Edlund, H., *Nature*, 1997, **385**, 257-260.
- Basch, M. L., Ohshima, T., Segil, N. and Groves, A. K., *J Neurosci*, 2011, **31**, 8046-8058.
- Bermingham, N. A., Hassan, B. A., Price, S. D., Vollrath, M. A., Ben-Arie, N., Eatock, R. A., Bellen, H. J., Lysakowski, A. and Zoghbi, H. Y., *Science*, 1999, **284**, 1837-1841.
- Burton, Q., Cole, L. K., Mulheisen, M., Chang, W. and Wu, D. K., *Dev Biol*, 2004, **272**, 161-175.
- Cai, C. L., Liang, X., Shi, Y., Chu, P. H., Pfaff, S. L., Chen, J. and Evans, S., *Dev Cell*, 2003, **5**, 877-889.
- Čihák, R. and Helekal, I., *Anatomie 3*, Grada, 1997.
- Daudet, N. and Lewis, J., *Development*, 2005, **132**, 541-551.
- Driver, E. C. and Kelley, M. W., *Birth Defects Res C Embryo Today*, 2009, **87**, 212-221.
- Ehret, G., Ehret, G. and Romand, R., *The Central Auditory System*, Oxford University Press, 1997.
- Fekete, D. M., *Curr Opin Neurobiol*, 1996, **6**, 533-541.
- Fettiplace, R. and Hackney, C. M., *Nat Rev Neurosci*, 2006, **7**, 19-29.
- Forge, A. and Wright, T., *Br Med Bull*, 2002, **63**, 5-24.
- Gibson, F., Walsh, J., Mburu, P., Varela, A., Brown, K. A., Antonio, M., Beisel, K. W., Steel, K. P. and Brown, S. D., *Nature*, 1995, **374**, 62-64.
- Hartman, B. H., Reh, T. A. and Bermingham-McDonogh, O., *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010, **107**, 15792-15797.
- Hasson, T., Heintzelman, M. B., Santos-Sacchi, J., Corey, D. P. and Mooseker, M. S., *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1995, **92**, 9815-9819.
- Heid, C. A., Stevens, J., Livak, K. J. and Williams, P. M., *Genome Res*, 1996, **6**, 986-994.
- Hobert, O. and Westphal, H., *Trends Genet*, 2000, **16**, 75-83.
- Huang, M., Sage, C., Li, H., Xiang, M., Heller, S. and Chen, Z. Y., *Dev Dyn*, 2008, **237**, 3305-3312.
- Cho, A., Haruyama, N. and Kulkarni, A. B., *Curr Protoc Cell Biol*, 2009, **Chapter 19**, Unit 19 11.
- Kelley, M., Wu, D. and Fay, R. R., *Development of the Inner Ear*, Springer, 2006.
- Kelley, M. W., *Nat Rev Neurosci*, 2006, **7**, 837-849.
- Kiernan, A. E., *Semin Cell Dev Biol*, 2013, **24**, 470-479.
- Kiernan, A. E., Pelling, A. L., Leung, K. K., Tang, A. S., Bell, D. M., Tease, C., Lovell-Badge, R., Steel, K. P. and Cheah, K. S., *Nature*, 2005, **434**, 1031-1035.
- Kiernan, A. E., Xu, J. and Gridley, T., *PLoS Genet*, 2006, **2**, e4.
- Kim, W. Y., Fritzschn, B., Serls, A., Bakel, L. A., Huang, E. J., Reichardt, L. F., Barth, D. S. and Lee, J. E., *Development*, 2001, **128**, 417-426.
- Lawoko-Kerali, G., Rivolta, M. N. and Holley, M., *J Comp Neurol*, 2002, **442**, 378-391.
- Li, H., Corrales, C. E., Wang, Z., Zhao, Y., Wang, Y., Liu, H. and Heller, S., *BMC Dev Biol*, 2005, **5**, 16.
- Liang, X., Song, M. R., Xu, Z., Lanuza, G. M., Liu, Y., Zhuang, T., Chen, Y., Pfaff, S. L., Evans, S. M. and Sun, Y., *Mol Cell Neurosci*, 2011, **47**, 215-222.

- Liu, M., Pereira, F. A., Price, S. D., Chu, M. J., Shope, C., Himes, D., Eatock, R. A., Brownell, W. E., Lysakowski, A. and Tsai, M. J., *Genes Dev*, 2000, **14**, 2839-2854.
- Ma, Q., Anderson, D. J. and Fritsch, B., *J Assoc Res Otolaryngol*, 2000, **1**, 129-143.
- Ma, Q., Chen, Z., del Barco Barrantes, I., de la Pompa, J. L. and Anderson, D. J., *Neuron*, 1998, **20**, 469-482.
- Magarinos, M., Contreras, J., Aburto, M. R. and Varela-Nieto, I., *Anat Rec (Hoboken)*, 2012, **295**, 1775-1790.
- Matei, V., Pauley, S., Kaing, S., Rowitch, D., Beisel, K. W., Morris, K., Feng, F., Jones, K., Lee, J. and Fritsch, B., *Dev Dyn*, 2005, **234**, 633-650.
- Muller, Y. L., Yueh, Y. G., Yaworsky, P. J., Salbaum, J. M. and Kappen, C., *FASEB J*, 2003, **17**, 1349-1351.
- Mullis, K., Faloon, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G. and Erlich, H., *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 1986, **51 Pt 1**, 263-273.
- Neves, J., Kamaid, A., Alsina, B. and Giraldez, F., *J Comp Neurol*, 2007, **503**, 487-500.
- Nieuwenhuys, R., J. Voogd, and C. van Huijzen *The Human Central Nervous System* Springer Berlin Heidelberg, 2008.
- Nornes, H. O., Dressler, G. R., Knapik, E. W., Deutsch, U. and Gruss, P., *Development*, 1990, **109**, 797-809.
- Pavlinkova, G., T. Chumak, L. Kuthanova, R. Bohuslavova, D. Buckiova, J. Syka, Thirty-Fifth Annual MidWinter Research Meeting of the Association for Research in Otolaryngology, San Diego, California, USA, 2012.
- Pfaff, S. L., Mendelsohn, M., Stewart, C. L., Edlund, T. and Jessell, T. M., *Cell*, 1996, **84**, 309-320.
- Pujades, C., Kamaid, A., Alsina, B. and Giraldez, F., *Dev Biol*, 2006, **292**, 55-67.
- Puligilla, C., Dabdoub, A., Brenowitz, S. D. and Kelley, M. W., *J Neurosci*, 2010, **30**, 714-722.
- Radde-Gallwitz, K., Pan, L., Gan, L., Lin, X., Segil, N. and Chen, P., *J Comp Neurol*, 2004, **477**, 412-421.
- Rowitch, D. H., Kispert, A. and McMahon, A. P., *Brain Res Dev Brain Res*, 1999, **117**, 99-108.
- Sahly, I., El-Amraoui, A., Abitbol, M., Petit, C. and Dufier, J. L., *Anat Embryol (Berl)*, 1997, **196**, 159-170.
- Schnupp, J., Nelken, I. and King, A., *Auditory Neuroscience: Making Sense of Sound*, MIT Press, 2011.
- Schoen, C. J., Burmeister, M. and Lesperance, M. M., *PLoS One*, 2013, **8**, e56520.
- Thor, S. and Thomas, J. B., *Neuron*, 1997, **18**, 397-409.
- Torres, M. and Giraldez, F., *Mech Dev*, 1998, **71**, 5-21.
- Torres, M., Gomez-Pardo, E. and Gruss, P., *Development*, 1996, **122**, 3381-3391.
- Vacek, Z., *Embryologie: učebnice pro studenty lékařství a oborů všeobecná sestra a porodní asistentka*, Grada, 2006.
- Walters, B. J. and Zuo, J., *Hear Res*, 2013, **297**, 68-83.
- Warchol, M. E. and Richardson, G. P., *Dev Neurobiol*, 2009, **69**, 191-202.
- Xue, Y., Gao, X., Lindsell, C. E., Norton, C. R., Chang, B., Hicks, C., Gendron-Maguire, M., Rand, E. B., Weinmaster, G. and Gridley, T., *Hum Mol Genet*, 1999, **8**, 723-730.

Svoluji k zapůjčení této práce pro studijní účely a prosím, aby byla řádně vedena evidence vypůjčovatelů.

Jméno a příjmení adresa	Číslo OP	Datum vypůjčení	Poznámka